

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
TERIOLOOGIA ÕPPETOOL

Liina Kinkar

PÕISTANG-PAELUSSI (*ECHINOCOCCUS
GRANULOSUS*) GENOTÜÜPIDE ERISTAMINE JA
FÜLOGEOGRAAFIA EUROOPAS

Magistritöö

Juhendaja: Ph.D. Urmas Saarma

TARTU 2014

Sisukord

Sissejuhatus	3
1. Valdkonna ülevaade	5
1.1 Mitokondriaalne DNA (mtDNA) geneetilise markerina	5
1.2 Perekond ehhinokokk (<i>Echinococcus</i>)	5
1.3 Põistang-paeluss (<i>Echinococcus granulosus</i>)	5
1.3.1. Põistang-paelussi tüved ning fülogeneetilised suhted	6
1.3.2. Elutsükkel	8
1.3.3. Tsüstiline ehhinokokoos	9
2. Materjal ja metoodika	11
2.1 Proovide kogumine	11
2.2 DNA eraldamine	11
2.3 DNA amplifitseerimine	11
2.4 Sekveneerimine	13
2.5 Andmeanalüüs	14
3. Tulemused	15
3.1 Kajastatud riigid, genotüübid ning peremehed	15
3.1.1 Euroopa	15
3.1.2. Aafrika	16
3.2 Genotüübid G1 ja G3	17
3.2.1 Genotüüpide G1 ja G3 fülogeneetilised võrgustikud	18
3.3 Genotüübid G6-G8 ja G10	21
3.3.1 Genotüüpide G6-G8 ja G10 fülogeneetilised võrgustikud	22
3.4 Genotüüpide G1, G3, G4-G8 ja G10 fülogeneetiline võrgustik	25
3.5 NAD1 geenifragmendi põhjal tehtud fülogeneetilised võrgustikud	25
3.5.1 Genotüübid G1 ja G3	25
3.5.2 Genotüübid G6-G8 ja G10	26
4. Arutelu	28
4.1 Töö olulisus ning hinnang valimile	28
4.1.1 Euroopa	28
4.1.2 Aafrika	29
4.2 Pikemate mtDNA järjestuste parem lahutusvõime	29
4.3 Genotüüpide kladidesisene eristamine ning selle olulisus	30
4.4 Genotüüpidesisene mitmekesisus ning fülogeograafia	31
Kokkuvõte	33
Summary	34
Tänuavaldused	35
Kasutatud kirjandus	36
Lisad	42

Sissejuhatus

Perekond ehhinokokk (*Echinococcus*) kuulub neljanapaliste (*Cyclophyllidea*) seltsi paeluslaste (*Taeniidae*) sugukonda. Ehhinokokid on imetajate parasiidid, kelle elutsükliks on vaja lõpp- ning vaheperemeest. Ehhinokokkide lõpp-peremeesteks on kiskjalised (*Carnivora*), vaheperemeesteks peamiselt sõralised (*Artiodactyla*) ning kabjalised (*Perissodactyla*), aga ka inimene. Ehhinokokkide vastsestaadium tekitab eluohtlikku ehhinokokoosi (Eckert et al, 2001).

Ehhinokokkide perekonda kuuluv põistang-paeluss (*Echinococcus granulosus*) on kosmopoliitse leviku ning laia peremeesliikide ringi tõttu väga ohtlik parasiit, kes tekitab tsüstilist ehhinokokoosi. Euroopas ning Aafrikas on põistang-paeluss laialt levinud, üheks probleemsemaks piirkonnaks maailmas peetakse Vahemere äärset ala. *E. granulosus* on geneetiliselt väga varieeruv ning jaotatud liigisiselt 10 tüveks ehk genotüübiks, mis erinevad peamiselt peremeesorganismide ning leviku poolest (Eckert & Deplazes, 2004).

Käesoleva töö eesmärgiks on leida lahendusi *E. granulosus* genotüüpide senisest paremaks lahutamiseks ning analüüsida põistang-paelussi geneetilist mitmekesisust ja fülogeograafiat mitokondriaalse DNA täisjärjestuste alusel mitmetes riikides üle Euroopa ning Aafrikas Sudaanis ja Keenias.

Mitmete põistang-paelussi genotüüpide lahutamine on seni olnud problemaatiline ja vaja oleks kindlamat geneetilist metoodikat nende lahutamiseks ning staatuse määratlemiseks - kas tegu on eraldiseisvate genotüüpidega või mitte. Kuna eri genotüüpidel on ka erinev patogeensus, on oluline õigesti määrata ka parasiidi genotüübiline kuuluvus, mis lühikeste geenijärjestuse alusel ei pruugi olla tuvastatav. Lisaks on siiani põistang-paelussi geneetilist mitmekesisust ja fülogeograafiat uuritud äärmiselt puudulikult, piirdudes lühikeste geenijärjestuste alusel tehtud analüüsidega üksikutes piirkondades. Mõistmaks paremini parasiidi genotüüpide leviku iseärasusi, seda mõjutavaid protsesse ning genotüüpide sisest ning vahelist varieeruvust geograafilises kontekstis, on oluline aga läbi viia ulatuslikum analüüs põistang-paelussi geneetilise mitmekesisuse kirjeldamiseks.

Töö hüpoteesid:

- 1) seni kasutatutest oluliselt pikemad mtDNA järjestused võimaldavad eristada genotüüpe senisest oluliselt paremini,
- 2) pikemad DNA järjestused annavad märgatavalt parema lahutusvõimega geneetilised võrgustikud, kui üksikute geenide põhjal tehtud analüüsid,
- 3) reeglina on geograafiliselt lähedasemad isendid ka geneetiliselt lähedasemad, kuid samas ei kehti see reegel mitte alati, eelkõige intensiivse loomakaubanduse läbi toimunud geenisiirde tõttu.

1. Valdkonna ülevaade

1.1 Mitokondriaalne DNA (mtDNA) geneetilise markerina

Paelusside mitokondri genoom on võrreldes tuumagenoomiga oluliselt väiksem (~13 000 aluspaari), kaheaheelaline mitokondrites asuv DNA. Erinevalt tuuma DNAST, mis päritakse mõlemalt vanemalt, pärandub mitokondriaalne DNA (mtDNA) reeglina emaliini pidi. Mitogenoomis on 37 kodeerivat geeni, neist 13 kodeerivad valke, 22 tRNA-d ning 2 rRNA suurt ja väikest alaühikut (Castro et al, 1998; Schwartz & Vissing, 2002).

MtDNA on rakus kuni mitmete tuhandete koopiatena, reeglina ei rekombineeru ning muutub ajas ja põlvkondade vahel ainult sedavõrd, kui palju neisse aja jooksul mutatsioone koguneb. Samuti omab genoom kõrget mutatsioonikiirust. Nende omaduste tõttu on mtDNA väga populaarseks markeriks geneetilise mitmekesisuse uurimiseks, nii liigisiselt kui ka lähedas suguluses olevate liikide puhul (Brown et al, 1979; Castro et al, 1998).

1.2 Perekond ehhinokokk (*Echinococcus*)

Ehchinokokkide perekonnas eristatakse viit liiki: *Echinococcus granulosus* (põistang-paeluss), *E. multilocularis* (alveokokk-paeluss), *E. oligarthrus*, *E. vogeli* ning hiljuti kirjeldatud *E. shiquicus* (Xiao et al, 2005). Põistang-paeluss on kosmopoliitse levikuga, alveokokk-paelussi leidub Kesk- ja Põhja-Euraasias ning Põhja-Ameerikas. *E. oligarthrus* ja *E. vogeli* on levinud Kesk- ja Lõuna-Ameerikas ning *E. shiquicus* Tiibeti platool (Eckert et al, 2001; Xiao et al, 2005). Eriti ohtlik on kõige laiemal geograafilisel leviku ning peremeesorganismide mitmekesisuse poolest põistang-paeluss.

1.3 Põistang-paeluss (*Echinococcus granulosus*)

Põistang-paeluss on kosmopoliitse levikuga parasiit. Eriti arvukalt leidub teda Euraasias, Venemaal ning seda ümbritsevates riikides, Vahemere ääres, Ida- ning Põhja-Aafrikas, samuti Lõuna-Ameerikas ning Austraalias (McManus et al, 2003). Täiskasvanud uss on 2-7 mm pikkune, stroobila koosneb tavaliselt 3-4 lülist. Päisel on neli iminappa ning kahes reas paiknevad noogud. Viimases lüli paikneb emakas munadega. Keskkonnas on munad

suhteliselt püsivad ning võivad nakkusohtlikud püsida kuid kuni aastaid (Eckert et al, 2001; Eckert & Deplazes, 2004).

Lõpp-peremehena kasutab *E. granulosus* erinevaid koerlasi (*Canidae*), põhiliselt koer või hunt (*Canis lupus*), Aafrikas tüüpiliselt ka šaakal (*C. mesomelas* ja *C. aureus*), tähnikhüään (*Crocuta crocuta*) ning hüäänkoer (*Lycaon pictus*) (Eckert et al, 2001; Eckert & Deplazes, 2004). Samuti on Aafrikas lõvilt (*Panthera leo*) leitud põistang-paeluss, keda on pakutud ka eraldi liigiks *E. felidis* (Hüttner et al, 2008; Thompson, 2008). Vaheperemeesteks on aga erinevad sõralised (*Artiodactyla*) ning kabjalised (*Perissodactyla*) nagu lammas (*Ovis aries*), metssiga (*Sus scrofa*), hobune (*Equus caballus*), veis (*Bos primigenius*), põder (*Alces Alces*), põhjapõder (*Rangifer tarandus*) jt (Eckert et al, 2001; Eckert & Deplazes, 2004). Nakatuda võivad ka teised imetajaliigid, sealhulgas näiteks jäneselised (*Lagomorpha*), närilised (*Rodentia*), ka inimene. Kuna parasiidi elutsükel eeldab kiskja-saagi suhte olemasolu, on inimene enamjaolt parasiidi tupikperemeheks ning ei oma rolli haiguse edasikandumises (Eckert & Deplazes, 2004). Ida-Aafrikas, näiteks Keenias Turkana piirkonnas, ei maeta surnuid. Koerad ning muud kiskjad pääsevad ligi inimjäänustele ning võivad nakatuda. Sel juhul võib ka inimene olla haiguse edasikandjaks (McManus et al, 2003).

1.3.1. Põistang-paelussi tüved ning fülogeneetilised suhted

Suure varieeruvuse tõttu on *E. granulosus* mtDNA alusel jaotatud kümneks tüveks ehk genotüübiks (G1-G10) (McManus & Thompson, 2003; Lavikainen et al, 2003; Saarma et al, 2009). Poolas avastatud inimese-spetsiifilist tüve (G9) peetakse mittekehtivaks (Kedra et al, 1999). Lõvi tüve staatus ei ole selge, kuid teda on erinevate allikate kohaselt pakutud kas põistang-paelussi tüveks või eraldi liigiks *E. felidis* (Hüttner et al, 2008; Thompson, 2008; Saarma et al, 2009).

Tüved erinevad põhiliselt peremeesorganismide ringi ning leviku poolest, aga ka nakatamisvõime, morfoloogia ja muude tunnuste poolest. Genotüübid on nime saanud oma peamise vaheperemehe järgi, kuid võivad nakatada ka muid liike. Eristatakse lamba (G1), Tasmaania lamba (G2), pühvli (G3), hobuse (G4), veise (G5), kaameli (G6), sea (G7), hirvlaste (G8), Fennoskandia hirvlaste (G10) ning lõvi tüve/liiki (vt Tabel 1). Genotüüpide numbrid kajastavad järjekorda, milles genotüübid on kirjeldatud (Eckert et al, 2001; Moro & Schantz, 2009; Saarma et al, 2009).

Lamba tüvi on kosmopoliitse levikuga, Tasmaania lamba genotüüpi on kirjeldatud Aasias, Lõuna-Ameerikas, Aafrikas, Euroopas ning Tasmaanial. Pühvli tüve on leitud Aasiast, Euroopast ning hobuse tüvi levib Euroopas, Lähis-Idas ning Aafrikas. Veise genotüüp on kirjeldatud Lähis-Idas, Aafrikas, Aasias, Lõuna-Ameerikas, Venemaal, kaameli tüvi Euroopas, Lähis-idas, Aafrikas, Aasias, Lõuna-Ameerikas, sea genotüüp Euroopas, Venemaal, Lõuna-Ameerikas ning Mehhikos. Hirvlaste tüved G8 ja G10 levivad Euraasias ning Põhja-Ameerikas. Lõvi tüvi on leitud vaid Aafrikast (Internet 1; Eckert et al, 2001; Eckert ja Deplazes, 2004; Hüttner et al, 2008).

Tabel 1. Põistang-paelussi võimalikud lõpp- ning vaheperemehed, genotüübid ning nende võimalik liigiline kuuluvus (Internet 1; McManus & Thompson, 2003; Obwaller et al, 2004; Busi et al, 2007; Nakao et al, 2007; Varcasia et al, 2008; Hüttner & Romig, 2009; Saarma et al, 2009).

Genotüüp/tüvi	Lõpp-peremehed	Vaheperemehed	Liik
Lamba (G1)	Koer, rebane, šaakal, hüään	Lammas, veis, siga, kaamel, kits, inimene, pühvel, hobune	<i>E. granulosus sensu stricto</i>
Tasmaania lamba (G2)	Koer	Lammas, veis, kaamel, inimene	<i>E. granulosus sensu stricto</i>
Pühvli (G3)	Koer	Pühvel, lammas, inimene, siga	<i>E. granulosus sensu stricto</i>
Hobuse (G4)	Koer	Hobune ning teised kabjalised	<i>E. equinus</i>
Veise (G5)	Koer	Veis, kaamel, inimene, kits, lammas, pühvel, sebra	<i>E. ortleppi</i>
Kaameli (G6)	Koer	Kaamel, kits, inimene, veis, lammas	<i>E. canadensis/E. intermedius</i>
Sea (G7)	Koer	Siga, metssiga, kits, kobras, veis, inimene	<i>E. canadensis/E. intermedius</i>
Hirvlaste (G8)	Hunt, koer	Pöder, inimene, metskits	<i>E. canadensis</i>
Fennoskandia hirvlaste (G10)	Hunt, koer	Pöder, põhjapöder, inimene	<i>E. canadensis</i>
Lõvi	Lõvi	Sebra, antiloobid	<i>E. felidis</i>

Perekonna *Echinococcus* klassifikatsiooni osas ei ole päris selgusele jõutud. Fülogeneesipuid on koostatud nii mtDNA kui ka tuumageenide järjestuse alusel (Nakao et al, 2007; Saarma et al, 2009; Knapp et al, 2011). Kui mitokondri genoomijärjestuste alusel saadud fülogenees

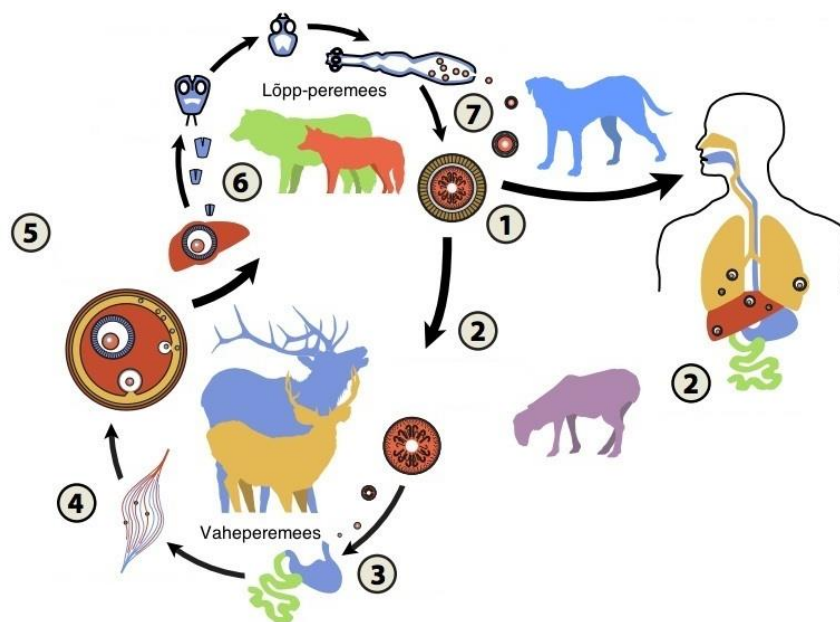
(Nakao et al, 2007) sarnaneb Knapp et al (2011) tuumageenide järjestuse põhjal koostatud fülogeneesipuuga, siis Saarma et al (2009), kes kasutasid erinevat valikut tuumageene võrreldes Knapp et al (2011), said erineva puu. Peamiseks erinevuseks puude vahel on, see et Saarma et al (2009) fülogeneesil moodustavad *E. granulosus* tüved monofüleetilise klaadi ning *E. multilocularis* on teiste ehhinokokkide sõsartakson, siis nii Nakao et al (2007) ja Knapp et al (2011) kui ka varasemate mtDNA uuringute põhjal saadud tulemuste alusel moodustavad genotüübid aga parafüleetilise puu, millel *E. multilocularis* ja *E. shiquicus* on paigutatud põistang-paelussi *E. granulosus* eri genotüüpide vahele. Lisaks erisustele on neis töödes saadud fülogeneesidel ka sarnasusi: kõik kinnitavad, et genotüübid G1-G3 on lähedalt suguluses ja moodustavad klaadi koondnimetusega *E. granulosus sensu stricto* ning *E. felidis* on G1-G3 sõsartakson. Arvatakse, et *E. felidis* on omanud klaadiga ühist eellast, kuid hargnenud hiljem eraldi liigiks (Hüttner et al, 2008; Thompson, 2008; Saarma et al, 2009). Samuti annavad nii mtDNA kui ka tuumageenide analüüs tulemuseks, et genotüübid G4 ning G5 võiksid olla eraldi liigid, vastavalt *E. equinus* ja *E. ortleppi*. Saarma et al (2009) tuumageenide analüüsi alusel moodustavad G6/G7 klaadi nimega *E. intermedius* ning nende sõsarklaadiks on G8/G10 klaad liiginimega *E. canadensis* (vt Tabel 1). MtDNA analüüs ning Knapp et al (2011) paigutaksid aga G6-G10 tüved ühe liigi alla nimega *E. canadensis* (Nakao et al, 2007; Thompson, 2008; Saarma et al, 2009; Knapp et al, 2011).

1.3.2. Elutsükkel

Parasiidi edasikandumisel eristatakse kolme elutsükli: metsloomade-, koduloomade- ning segatsükkel. Metsloomade tsükli puhul nakatuvad vaid metsloomad, koduloomade tsükli puhul koduloomad ning segatsükli vahe- ning lõpp-peremeesteks võivad olla nii mets- kui ka koduloomad (Eckert & Deplazes, 2004).

Parasiidi elutsüklik on vaja lõpp-peremeest, kelles elutsevad täiskasvanud ussid ning vaheperemeest, kelles arenevad vastsed. Täiskasvanud põistang-paeluss elutseb lõpp-peremehe peensooles ning toodab mune, mis sisaldavad esimese kasvujärgu vastset onkosfääri. Munad või mune sisaldavad küpsed lülid väljutatakse seedetrakti kaudu keskkonda, sobiv vaheperemees nakatub neid sisse süües. Peensoole ensüümide toimel vabaneb munast onkosfäär, mis tungib läbi soole seina ning kandub passiivselt vere- või lümfivooluga erinevatesse organitesse, kus vastne ehhinokokipõieks ehk tsüstiks areneb. Parasiidi tsüstid on enamasti unilokulaarsed, tütar-tsüstid võivad areneda ka olemasoleva tsüsti sisse. Kõige

sagedamini nakatub maks ning kops, aga ka neer, põrn, aju, lihased ning muud organid. Põie sisemisest, germinatiivsest kihist, arenevad haudekapslid, mille sisemisest kihist arenevad mittesugulisel teel protoskooleksid. Põies vabalt hõljuvaid haudekapsleid ning protoskoolekseid nimetatakse hüdatiidliivaks (*hydatid sand*). Tsüsti purunemisel võivad hüdatiidliivast areneda uued tsüstid. Põies võib paikneda tuhandeid protoskoolekseid. Tsükkel jõuab lõpule, kui sobiv lõpp-peremees sööb vaheperemehe nakatunud organeid. Protoskooleksid kinnituvad lõpp-peremehe peensoole limaskestale ning arenevad täiskasvanud ussiks. Täiskasvanud põistang-paeluss on hermafrodiit ning paljuneb suguliselt. Uss saavutab suguküpsuse 4-5 nädala möödudes (vt Joonis 1) (Internet 1; Eckert et al, 2001; McManus et al 2003; Eckert & Deplazes, 2004; Moro & Schantz, 2009).



Joonis 1. Põistang-paelussi elutsükkel. Põistang-paelussi lõpp-peremehest väljub küps muna roojaga keskkonda ①. Inimene nakatub ② põhiliselt koera kaudu. Munad võivad kinni jääda koera karvadesse ning sattuda sealt inimese suhu. Kuna inimene ei mängi enamasti rolli parasiidi edasikandumisel, nimetatakse teda tupikperemeheks. Nakkust võivad aga edasi kanda erinevad sõralised ja kabjalised, kes muna samuti alla võivad neelata ②. Vaheperemehe seedekulglas väljub onkosfäär munast ③ ning kandub vere- või lümfivooluga ④ erinevatesse organitesse. Onkosfäär areneb põieks enamasti maksas ⑤. Koerlasest lõpp-peremees nakatub vaheperemehe organeid süües ⑥. Põies arenenud protoskooleksid kinnituvad lõpp-peremehe peensoolde. Täiskasvanud uss arenevad munad, mis küpsedes ussist väljuvad ⑦.

1.3.3. Tsüstiline ehhinokokoos

Ehchinokokoos on laia levikuga zoonoos, mida tekitab perekonna *Echinococcus* vastsestaadium vahe- või tupikperemehes. Ehhinokoki liikidest põhjustavad haigust neli: *E. granulosus*

tsüstilist, *E. multilocularis* alveolaarset ning *E. vogeli* ja *E. oligarthus* polütsüstilist ehhinokokoosi (Eckert & Deplazes, 2004; Moro & Schantz, 2009). Põhjalikud andmed ehhinokokoosi põhjustamisest tüve *E. shiquicus* kohta puuduvad (McManus et al, 2003; Moro & Schantz, 2009). Tsüstiline ehhinokokoos on endeemiline Lõuna-Ameerikas, Vahemere äärsel alal, Venemaa lõuna- ning keskosas, Kesk-Aasias, Hiinas, Austraalias ja Aafrikas (Moro & Schantz, 2009).

Kõige laiemalt on levinud tsüstiline ehhinokokoos, mida tekitab *E. granulosus*. Esmase infektsiooni algus on alati asümptomaatiline, sümptomid tekivad alles hiljem, näiteks kui tsüst puruneb, tekitades allergilist reaktsiooni või avaldades survet mõnele organile (Internet 1; McManus et al, 2003; Moro & Schantz, 2008). Tsüstilist ehhinokokoosi peetakse mitmetes piirkondades tähelepanuta jäänud zoonoosiks, kuna endeemilised piirkonnad on üldiselt väga vaesed alad, kus ei ole piisavalt ressursse olukorra parandamiseks, samuti ei pööra seal meedia ehhinokokoosile suurt tähelepanu (Batelli, 2009). Haiguse tõttu suureneb kodu- ning metsloomade suremus, samuti toob see kaasa suured majanduslikud kahjud, langeb liha, piima või villa kvaliteet (Batelli, 2009). Lühiealistel loomadel ei pruugi elu jooksul sümptomid avalduda, pikaelistel loomadel, näiteks hobune, võib haigus tekitada aga tõsisid terviseprobleeme (Internet 1).

Inimestel võivad tsüstilist ehhinokokoosi tekitada mitmed tüved, kõige sagedamini on selleks lamba genotüüp G1 (Eckert & Deplazes, 2004). Tsüstide suurus võib olla väga varieeruv. Tavaliselt jääb diameeter vahemikku 1-15 cm, aga on leitud ka suuremaid tsüste. Inimesed võivad nakkuse saada olles kontaktis nakatunud lõpp-peremehega või nende roojaga. Munad võivad sattuda ka puu- ning juurviljadele või vette (Internet 1).

Tsüstilise ehhinokokoosi levimise ning püsimise põhjuseid on mitmeid (Eckert & Deplazes, 2004; Batelli, 2009):

1. hulkuvate koerte suur arv,
2. koertele söödetakse tapetud loomade sisikondi,
3. koertel on kerge juurdepääs nakatunud organitele,
4. illegaalne järelvalveta koduloomade tapmine,
5. tihe läbikäimine koerte ning teiste koduloomade vahel,
6. riikidevaheline loomakaubandus,
7. vaesed elamistingimused,
8. rahalised piirangud.

2. Materjal ja metoodika

2.1 Proovide kogumine

Käesolevas töös kasutatud 143 DNA proovi ning 144 koeproovi on kogutud paljudelt rahvusvahelistelt koostööpartneritelt. Proovidega saadeti ka teadaolevad andmed nende täpsema päritolu, peremeeslooma, nakatunud organi ning genotüübilise kuuluvuse kohta (vt Lisad, Tabel S1).

2.2 DNA eraldamine

Koeproovidest eraldati DNA *High Pure PCR Template Preparation Kit*'iga (Roche) vastavalt protokollile.

2.3 DNA amplifitseerimine

Töö algne eesmärk oli sekveneerida mitokondri täisgenoomid. PCR-il kasutati Urmas Saarma poolt eelnevalt välja töötatud praimereid täisgenoomi sekveneerimiseks.

Praimereid testiti eri genotüüpidega erinevatel PCR-i tingimustel. Lõplikku analüüsi kaasati praimerid, mis töötasid kõikide genotüüpidega ning selgitati PCR-i tingimused, millega amplifitseerimise produkt oli tugevaim. Erinevateks testitud seondumistemperatuuride vahemikeks olid 53°C – 48 °C, 58°C – 53°C ning 55°C - 50°C ning ensüümideks 50x Phusion II, 50x Titanium ja Advantage 2 Taq polümeraas (Clontech). Kõige sobivamaks osutus ensüüm 50x Advantage 2 Taq polümeraasi (Clontech) seondumistemperatuuril 55°C - 50°C. 13-st välja töötatud praimerist, kaasati analüüsi 8 (vt Tabel 1). Võttes arvesse ka kehva kvaliteedi tõttu eemaldatud piirkonnad, on analüüsiks olevate järjestuste pikkuseks kokku 7188 aluspaari. Töös kasutatava järjestuste hulka kuuluvad 14 täispikkuses geeni: CYTB (717...1784), ND4L (1789...2058), ATP6 (3473...3985), NAD1 (5100...5993), tRNA-Gln (3282...3343), tRNA-Phe (3343...3405), tRNA-Met (3402...3467), tRNA-Val (4900...4962), tRNA-Ala (4968...5031), tRNA-Asp (5032...5096), tRNA-Asn (6010...6075), tRNA-Thr (8358...8422), tRNA-Cys (9400...9462) ning s-rRNA (9463...10162).

Tabel 1. Analüüsiks kasutatavad praimerid ning nende järjestused.

Praimer	Praimeri järjestus
Ef1	TCGTTTTACACGCGATTGAACT
Er1	ACCTGCTATGCAGCCCTATT
E4f2	GTGATCCTATTTTATTTCAAC
E4r	TGCTACCTTTGCACAGTCAA
E5f	ATGTATGTGGCTAGAAGGTC
E5r	CAAGAGTGAAATAATAGGTGGA
E6f	TAAGGGTGATGCAATTTGAG
E6r	ACAACCATCTACAGCACGAA
E10f	GATTACTGTTACTGGTTTTCA
E10r	CAACTTAAAAACAAGCATCATCA
E11f	TTTTATGCTATTCTTCGGTGTA
E11r	CAAAAACACCTCATTAACCAC
E12f	TTGTGGTGTTTTTATGATG
E12r	CACAGACGATAACCCAGA
E13f	CGGGTCTTTTATTTTGATGTTG
E13r	GATCCAAAAGCACATCGA

PCR viidi läbi 20 µl-s ja reaktsioonisegu sisaldas 15,4 µl milli-Q puhtusega vett, 2 µl 10x Advantage 2 puhvrit (Clontech), 0,4 µl dNTP-de segu (10mM, Fermentas; lõppkontsentratsioon 0,2 mM), 1 µl vastavat praimerid segu (5 pmol/µl; lõppkontsentratsioon 0,5 µM) ja 0,2 µl 50x Advantage 2 Taq polümeraasi (Clontech). Positiivsele proovile lisati 1 µl eraldatud DNAd, negatiivsele proovile DNAd ei lisatud.

PCR-i reaktsioonid viidi läbi masinal Eppendorf Mastercycler® Pro kui ka Biometra® TProfessional, tingimusteks olid:

95 °C	1 min	
95 °C	20 s	
55 °C	45 s	-0,5 °C iga tsükli kohta, 10 tsüklit
68 °C	2 min	
95 °C	20 s	
50 °C	45 s	25 tsüklit
68 °C	2 min	
68 °C	3 min	
5 °C	paus	

Saadud PCR-i produktide olemasolu kontrolliti agaros-geel-elektroforeesil 1xTAE (Tris-acetate-EDTA, pH 8,0) puhvris. Produktist 10 µl, kanti geelile ja lahutati elektroforeesil 150 V juures. Molekulmassi markerina kasutati O'GeneRuler 1 kb Plus (Fermentas), DNA visualiseerimiseks lisati 50 ml geelile 7 µl etiidiumbromiidi (10 mg/ml, lõppkontsentratsioon 1,4 µg/ml). Geel fotografeeriti UV-valguses UVIPro Gold masinaga ning tulemus salvestati UVI Pro tarkvara abil.

Igale 10 µl PCR-i produktile lisati 1 µl puhastussegu, mille jaoks kasutati 0,05 µl eksonukleas I (EXO I, Fermentas, 20U/µl; lõppkontsentratsioon 1U/µl) ning 1 µl aluselist fosfataasi (FastAP, Fermentas, 1U/µl; lõppkontsentratsioon 1U/µl).

Puhastusreaktsioonid viidi läbi masinal Eppendorf Mastercycler® Pro kui ka Biometra® TProfessional, tingimusteks olid:

37 °C	30 min
80 °C	15 min
4 °C	paus

2.4 Sekveneerimine

Puhastatud PCR-i produktid saadeti sekveneerimiseks nii Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse, kui ka firmasse MacroGen.

Osadele proovidele (14) tehti sekveneerimisreaktsioonid ise. Reaktsioonid viidi läbi kitiga BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 10 µl-s ja reaktsioonisegu sisaldas 4,7 µl vett, 2 µl BigDye 5x sekveneerimispuhvrit, 1,6 µl sekveneerimispraimerit (1 pmol/µl; lõppkontsentratsioon 0,16 µM) ning 0,7 µl BigDye segu. Segule lisati 1 µl eelnevalt puhastatud PCR-i produkti.

Sekveneerimisreaktsioonid viidi läbi masinal Eppendorf Mastercycler® Pro kui ka Biometra® TProfessional, tingimusteks olid:

96 °C	1 min	
96 °C	10 s	
50 °C	15 s	25 tsüklit
60 °C	4 min	
7 °C	paus	

DNA sadestamiseks lisati sekveneerimisreaktsiooni produktile 2 µl dekstraanilahust (1.M NaOAc/250mM EDTA/dekstraan) ja 33 µl etanooli (96%) ning hoiti -20°C juures 30 minutit. Proovid tsentrifuugiti 25 minutit pööretel 11800 rpm (15°C). Seejärel eemaldati supernatant, pesti 170 µl etanooliga (70%) ning tsentrifuugiti 5 minutit pööretel 11800 rpm. Siis eemaldati supernatant ning lasti sademel kuivata toatemperatuuril 10 minutit. Seejärel lisati sademele 10 µl stopplahust (70% formamiid, 1mM EDTA pH 8,0) ning lasti toatemperatuuril 10 minutit lahustuda.

2.5 Andmeanalüüs

DNA järjestuste assambleerimiseks ning kontrollimiseks kasutati programme CodonCode v4.2.7 ning BioEdit v7.2.5, joondamiseks kasutatud referentsjärjestuse GenBank ID: NC_008075.1 (Yang et al, 2005).

Lisaks koostati võrgustikud ka NADH dehdrogenaasi subühik 1 (NAD1) geenifragmendi (343 ap) põhjal (GenBank ID: KC579443; Andresiuk et al, 2013).

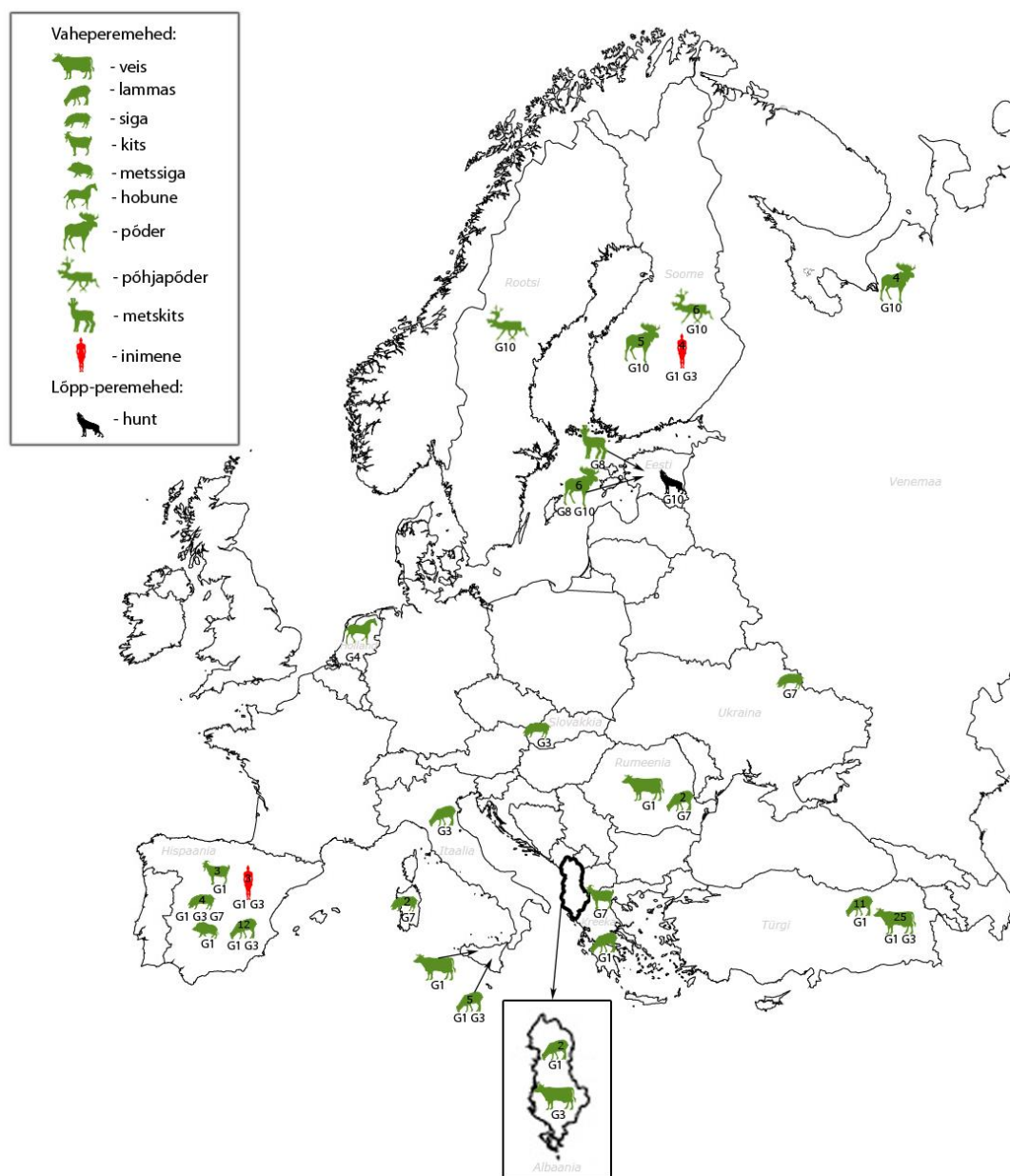
Fülogeneetiliste võrgustike koostamiseks kasutati programme DnaSP v5.10.01 ning Network v4.6.1.2.

3. Tulemused

3.1 Kajastatud riigid, genotüübid ning peremehed

3.1.1 Euroopa

Praimerite seondumist testiti Euroopast kokku 251 proovil, kõik analüüsi kaasatud 8 praimerit töötasid 108 proovil – nende proovide asukohad, peremehed ning genotüübiline kuuluvus on kantud paremaks ülevaate saamiseks kaardile (vt Joonis 2).



Joonis 2. Euroopast analüüsitud proovide asukohad, peremehed ning genotüübid. Loomadel toodud arvud näitavad konkreetse peremehe proovide arvu antud piirkonnas.

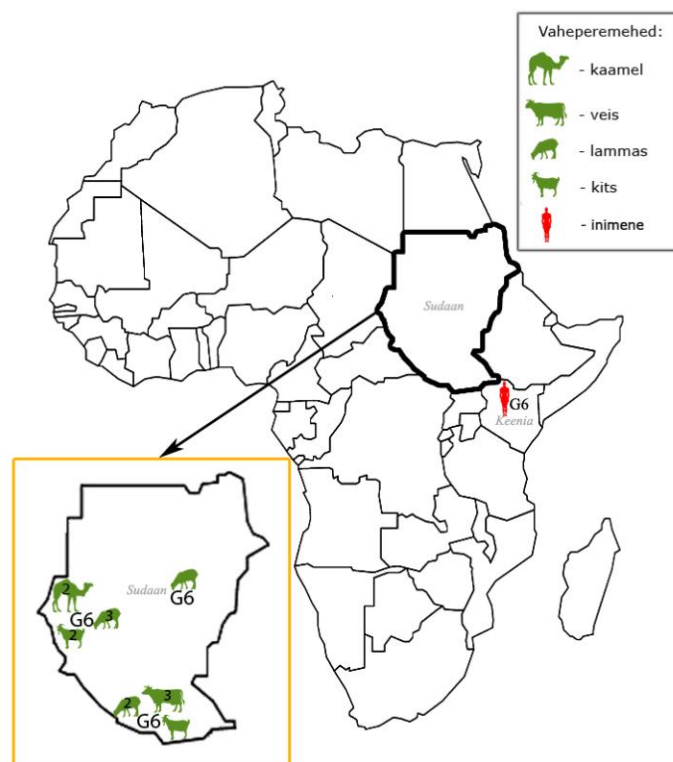
Euroopast on proove 13 riigist: Rootsist, Soomest, Venemaalt, Eestist, Slovakiast, Ukrainast, Hollandist, Albaaniast, Türgist, Rumeeniast, Kreekast, Itaaliast ning Hispaaniast. Põhjalikumalt on esindatud Türki ning Hispaania, kust on vastavalt 36 ning 23 proovi.

Genotüüpidest on esindatud G1, G3, G4 ning G7, esinedes põhiliselt Lõuna- ning Kesk-Euroopas, samuti G8 ning G10, Põhja-Euroopas. Kõige rohkem esineb Euroopas genotüüpi G1 (N=59), seejärel G10 (N=18), G3 (N=16), G7 (N=7), G8 (N=6) ning G4 (N=1).

Euroopas on proovidel ka lai peremeesloomade spekter. Nakatunud vaheperemeesteks olid koduloomadest lambad, kitsed, veised, sead ja hobune, metsloomadeks metssiga, metskits, põder ning põhjapõder. Samuti on valimi hulgas tupikperemees inimene ning lõpp-peremees hunt. Peale inimese, on Põhja-Euroopas proovid metsloomadelt, Lõuna-Euroopas valdavalt koduloomadelt.

3.1.2. Aafrika

Praimerite seondumist testiti Aafrikast kokku 28 proovil, kõik analüüsi kaasatud 8 praimerpaari töötasid 15 proovil - nende proovide asukohad, peremehed ning genotüübiline kuuluvus on kantud parema ülevaate saamiseks kaardile (vt Joonis 3).

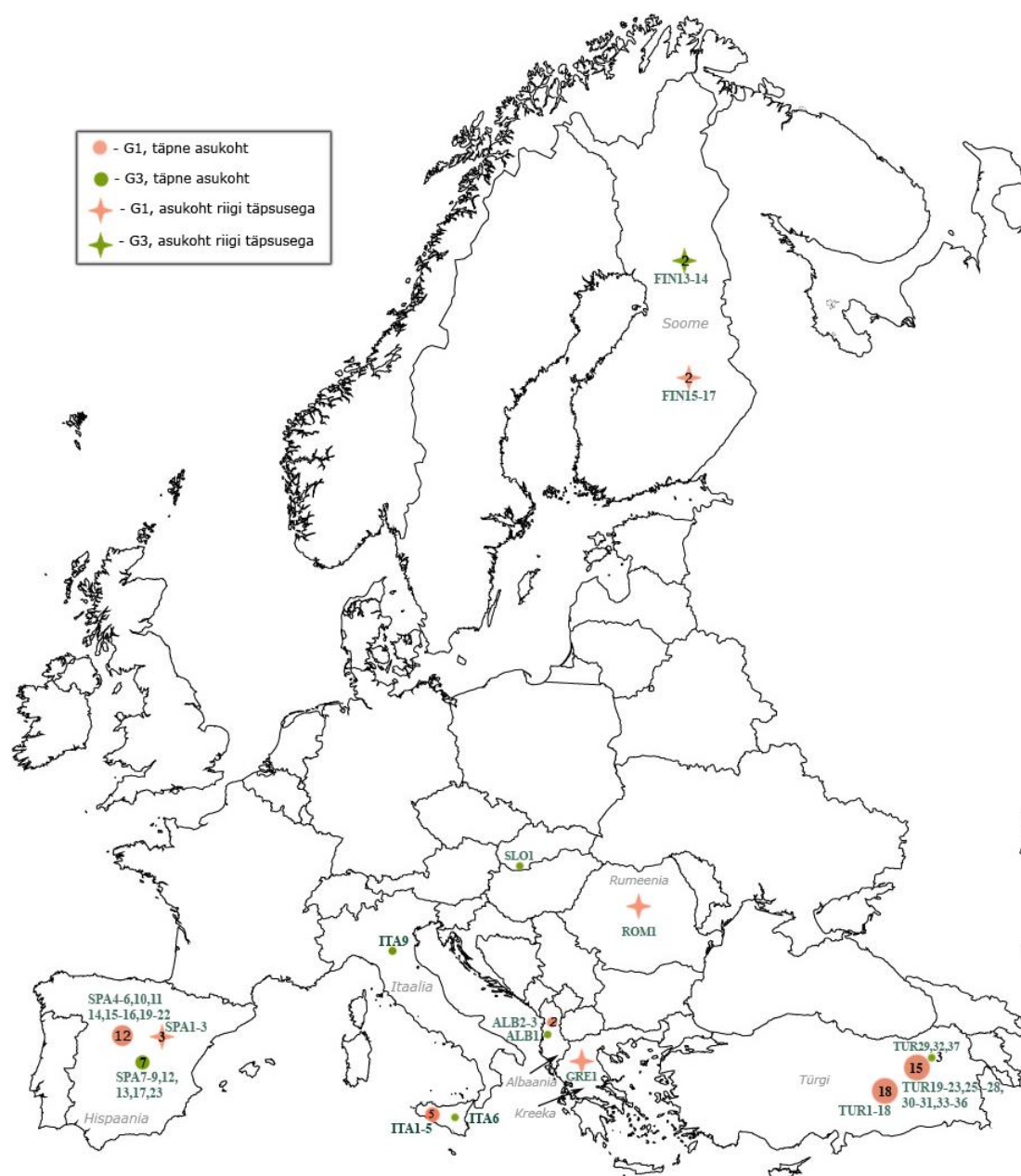


Joonis 3. Aafrikast analüüsitud proovide asukohad, peremehed ning genotüübid. Loomadel toodud arvud näitavad konkreetse peremehe proovide arvu antud piirkonnas.

Aafrikast on 14 proovi Sudaanist, kus on esindatud genotüüp G6 vaheperemeestel kaamelitel, veistel, lammastel ja kitsedel ning 1 proov Keeniast, kus oli genotüübiga G6 nakatunud inimene.

3.2 Genotüübid G1 ja G3

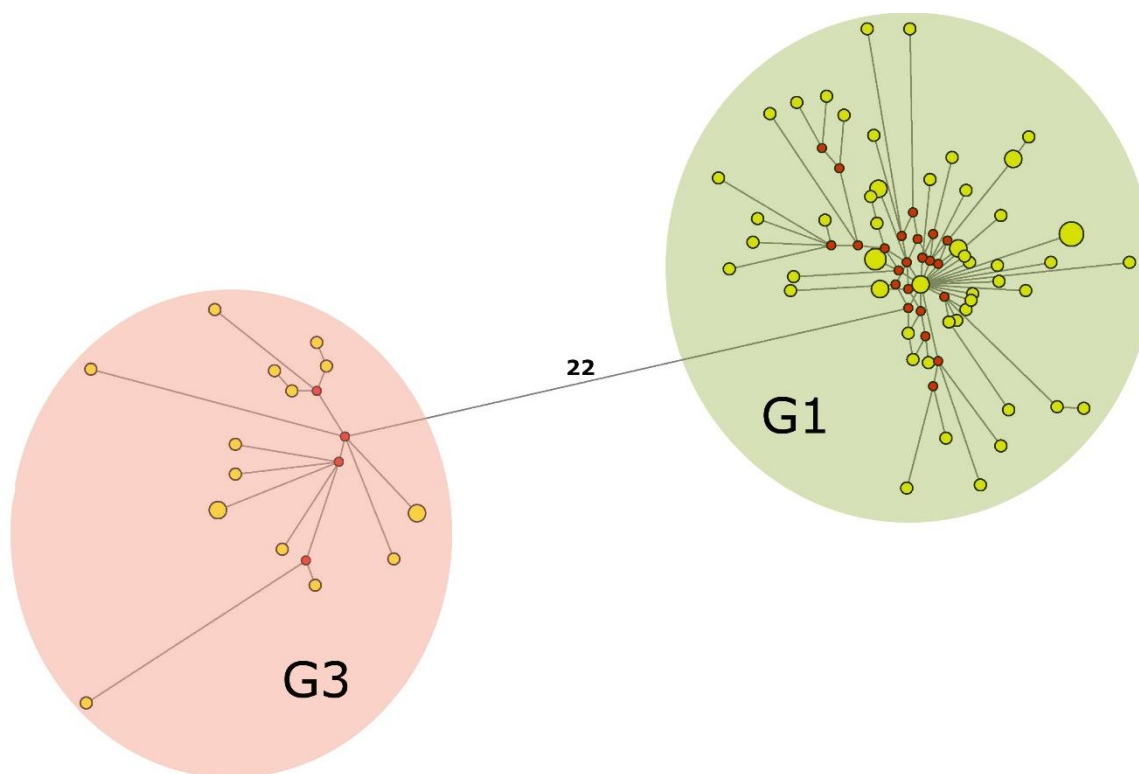
Klaadi *E. granulosus sensu stricto* kuuluvate genotüüpide G1 ning G3 proovide nimetused koos täpsete asukohtadega on toodud Joonisel 4 järgnevate fülogeneetiliste võrgustike paremaks jälgimiseks.



Joonis 4. Euroopa G1 ning G3 genotüüpi kuuluvate proovide täpsed asukohad proovide nimetustega. Proovidel toodud arvud näitavad proovide arvu antud piirkonnas.

3.2.1 Genotüüpide G1 ja G3 fülogeneetilised võrgustikud

Klaadi *E. granulosus* s. s. (G1-G3) kuuluvate genotüüpide G1 ning G3 eristumise analüüsiks koostatud fülogeneetiliselt võrgustikult ilmneb, et genotüübid on selgelt eristatavad (vt Joonis 5).

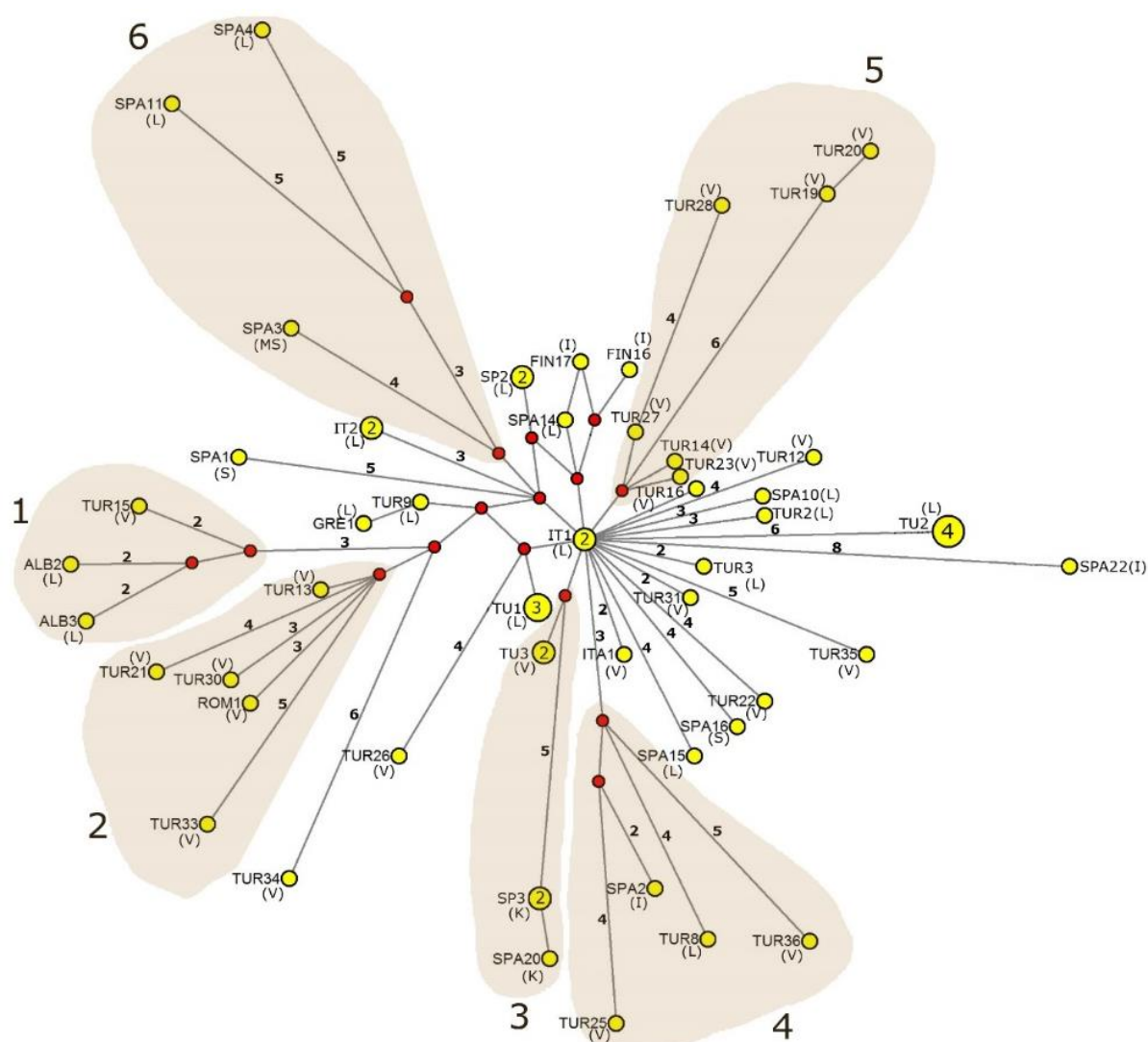


Joonis 5. Genotüüpide G1 ning G3 fülogeneetiline võrgustik. Genotüüpe ühendaval joonel olev arv tähistab gruppe eristavate mutatsioonide arvu.

3.2.1.1 Genotüübi G1 fülogeneetiline võrgustik

Analüüsimaaks G1 genotüübi sisest variatsiooni, koostati kõne all oleva tüve jaoks eraldi fülogeneetiline võrgustik (vt Joonis 6). Genotüübiks G1 on määratud 59 proovi, mis moodustavad fülogeneetiliselt võrgustikul 49 haplotüüpi. G1 tüve puhul ilmneb suur genotüübisine varieeruvus, piirkonnad on geneetiliselt segunenud, ei teki konkreetseid geograafilisi mustreid. Samuti ei esine märkimisväärset grupeerumist vaheperemeeste järgi, vaid haplogrupid 2 ning 5 on vaheperemeesteks vaid veised.

Eristub basaalne haplotüüp IT1, kuhu kuuluvad kaks proovi Itaaliast, millest lähtuvad kiirtena nii üksikud proovid kui ka eristatavad haplogrupid. Haplogruppides on üksteisest geograafiliselt suhteliselt kaugeid proove, näiteks leidub kahes haplogrupis proove nii Türgist kui ka Hispaaniast. Seda nii haplogrupi 4 puhul, kuhu kuuluvad proovid TUR8, TUR36, TUR25 ning SPA2, kui ka haplogrupi 3 puhul, kuhu kuuluvad proovid TU3, SP3, SPA20. Samuti moodustab proov TUR15 Türgist ühise haplogrupi 1 Albaania proovidega ALB2, ALB3. Eristada saab ka haplogruppi 2 proovidega TUR13, TUR21, TUR30, TUR33 Türgist ning ROM1 Rumeeniast.

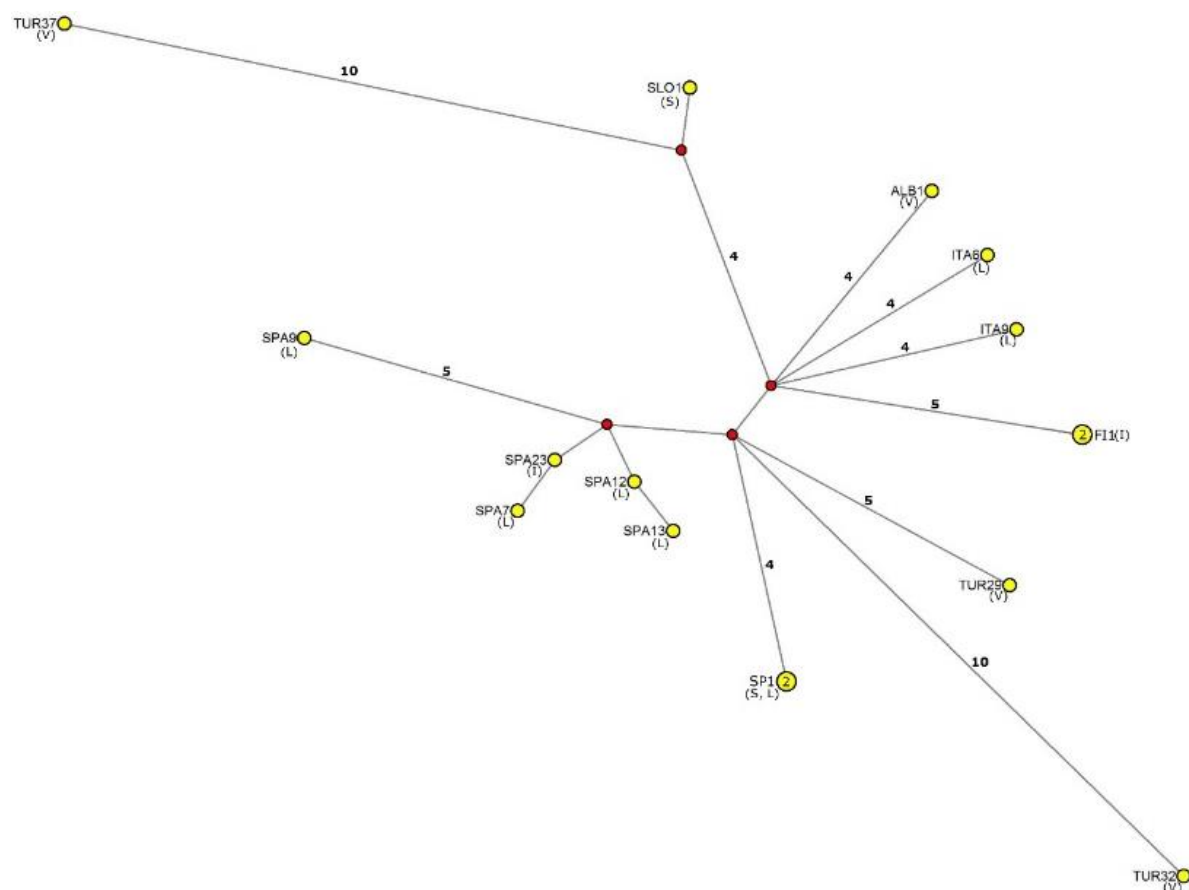


Joonis 6. Genotüübi G1 fülogeneetiline võrgustik. Haplotüüpe- ning grappe ühendavatel joontel kujutatud arvud tähistavad mutatsioonide arvu. Haplotüüpide sees olevad arvud tähistavad sinna kuuluvate proovide hulka. Sulgudes on toodud proovile vastav peremees: L – lammas, V – veis, I – inimene, S – siga, MS – metssiga, K – kits. Tabel haplotüüpide ning –gruppide tähistustele vastavate proovidega koos infoga peremehe, organi ning proovi asukoha kohta vt Lisad, Tabel S1. Kaart proovide nimetuste ning täpsete asukohtadega vt Joonis 4.

Samas eristuvad kaks haplogruppi, kuhu kuuluvad proovid vaid ühest riigist, täpsemalt haplogrupp 5 proovidega TUR28, TUR19, TUR20, TUR27, TUR14 ja TUR13 Türgist ning haplogrupp 6 proovidega SPA4, SPA11 ja SPA3 Hispaaniast. Ei eristu suuri haplotüüpe, kuhu kuuluksid paljud identsed proovid, kõige suurem on haplotüüp TU2, kuhu kuulvad 4 proovi Türgist. Kolm proovi kuuluvad haplotüüpi TU1, kaks haplotüüpidesse SP2, SP3, TU3, IT1 kui ka IT2. Basaalsest haplotüübist kõige kaugemale jäävad proovid SPA4 ning SPA10, mõlemaid eristab IT1-st 10 mutatsiooni.

3.2.1.2 Genotüübi G3 fülogeneetiline võrgustik

Analüüsima G3 genotüübi sisest variatsiooni, koostati kõne all oleva tüve jaoks eraldi fülogeneetiline võrgustik (vt Joonis 7).

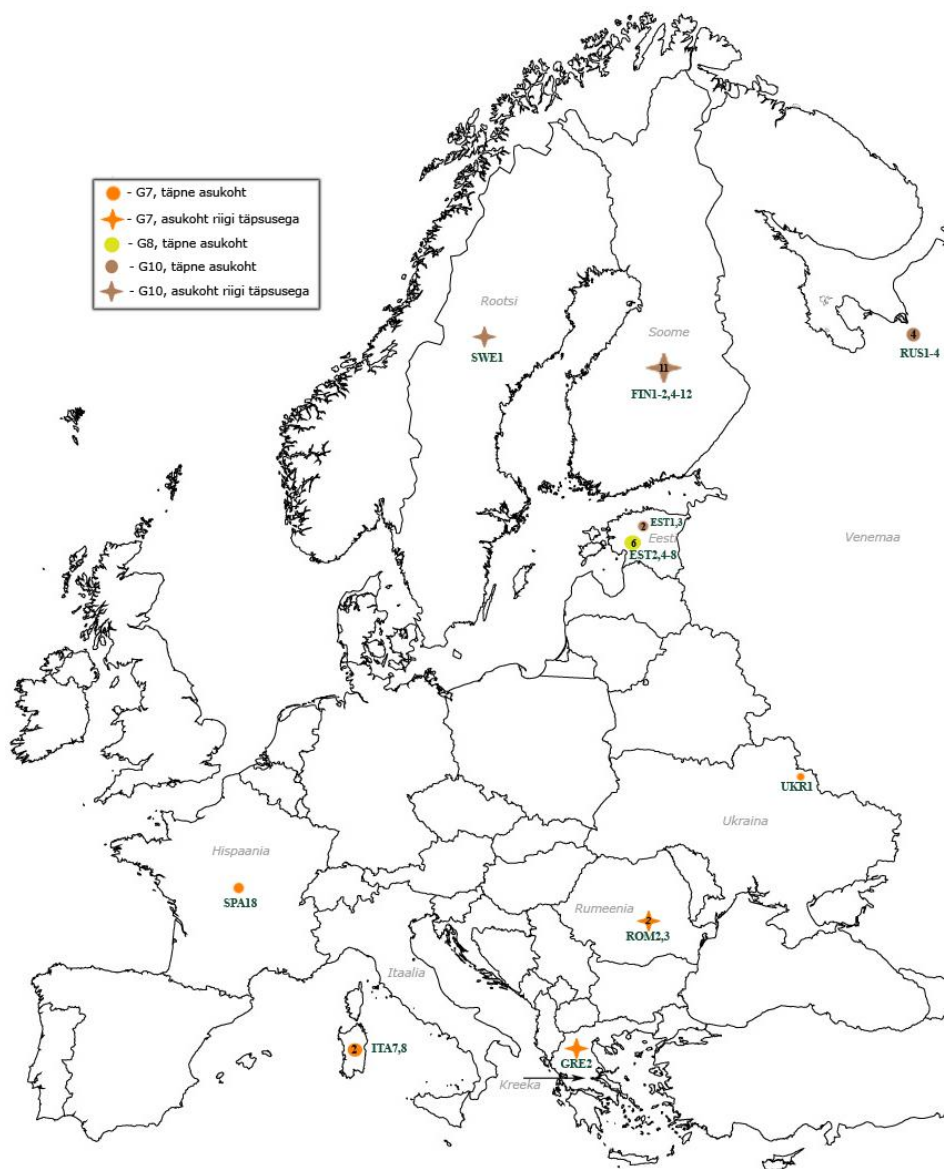


Joonis 7. Genotüübi G3 fülogeneetiline võrgustik. Haplotüüpe- ning grupe ühendavatel joontel kujutatud arvud tähistavad mutatsioonide arvu. Haplotüüpide sees olevad arvud tähistavad sinna kuuluvate proovide hulka. Sulgudes on toodud proovile vastav peremees: L – lammas, V – veis, I – inimene, S – siga. Tabel haplotüüpide ning –gruppide tähistustele vastavate proovidega koos infoga peremehe, organi ning proovi asukoha kohta vt Lisad, Tabel S1. Kaart proovide nimetuste ning täpsete asukohtadega vt Joonis 4.

Genotüübiks G3 on määratud 16 proovi, mis moodustavad fülogeneetilisel võrgustikul 14 haplotüüpi. Samuti ei eristu ka G3 genotüübi puhul geneetilises mitmekesisuses selget geograafilist mustrit, kuigi suhteliselt sarnased on 5 Hispaania proovi SPA9, SPA 23, SPA12, SPA7 ning SPA13. Eristuvad kaks haplotüüpi, SP1 ning FI1, kuhu kuuluvad 2 identset proovi (haplotüüpidele vastavaid proove vt Lisad, Tabel S1). Suhteliselt kaugel teistest proovidest paiknevad kaks türki proovi, TUR27 ning TUR32.

3.3 Genotüübid G6-G8 ja G10

Genotüüpide G6, G7, G8 ning G10 proovide nimetused koos täpsete asukohtadega on toodud Joonistel 8 ning 9 järgnevate fülogeneetiliste võrgustike paremaks jälgimiseks.



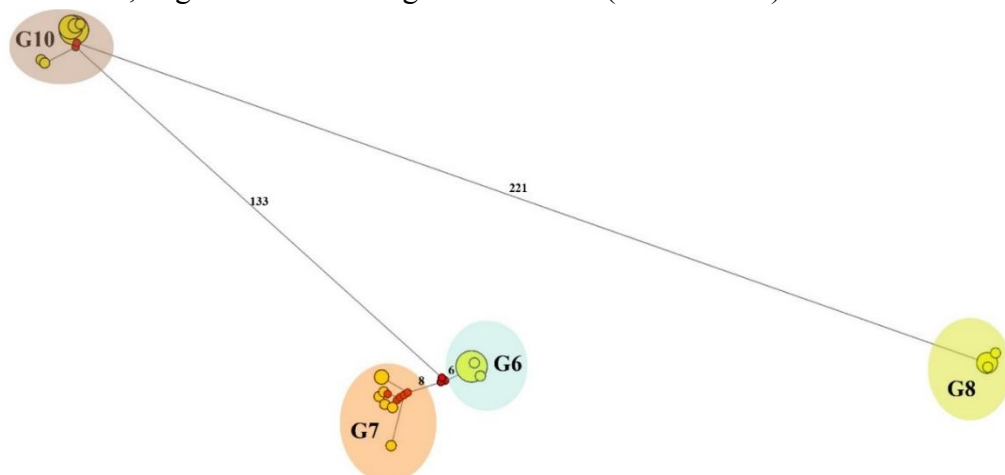
Joonis 8. G7, G8 ning G10 genotüüpi kuuluvate proovide täpsed asukohad proovide nimetustega Euroopas. Proovidel toodud arvud näitavad proovide arvu antud piirkonnas.



Joonis 9. G6 genotüüpi proovide täpsed asukohad proovide nimetustega Aafrikas. Proovidel toodud arvud näitavad proovide arvu antud piirkonnas.

3.3.1 Genotüüpide G6-G8 ja G10 fülogeneetilised võrgustikud

Genotüüpide G6, G7, G8 ning G10 eristumise analüüsiks koostatud fülogeneetiliselt võrgustikult ilmneb, et genotüübid on selgelt eristatavad (vt Joonis 10).



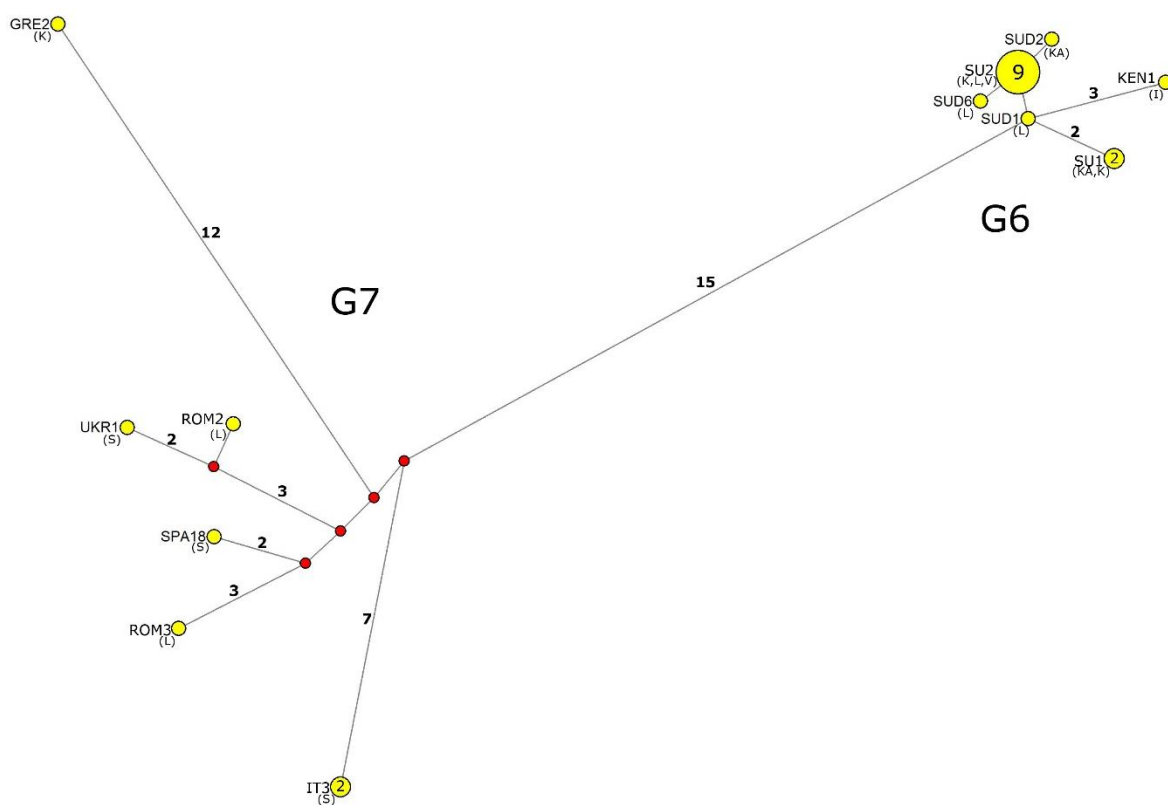
Joonis 10. Genotüüpide G6-G8 ning G10 fülogeneetiline võrgustik. Genotüüpe ühendaval joonel olev arv tähistab gruppe eristavate mutatsioonide arvu.

G10 genotüübi kaugus G6-st ning G7-st on märkimisväärselt väiksem kui G8-st.

3.3.1.1 Genotüüpide G6 ja G7 fülogeneetiline võrgustik

Analüüsimaaks G6 ning G7 genotüüpide sisest variatsiooni, koostati kõne all olevate tüvede jaoks eraldi fülogeneetiline võrgustik (vt Joonis 11).

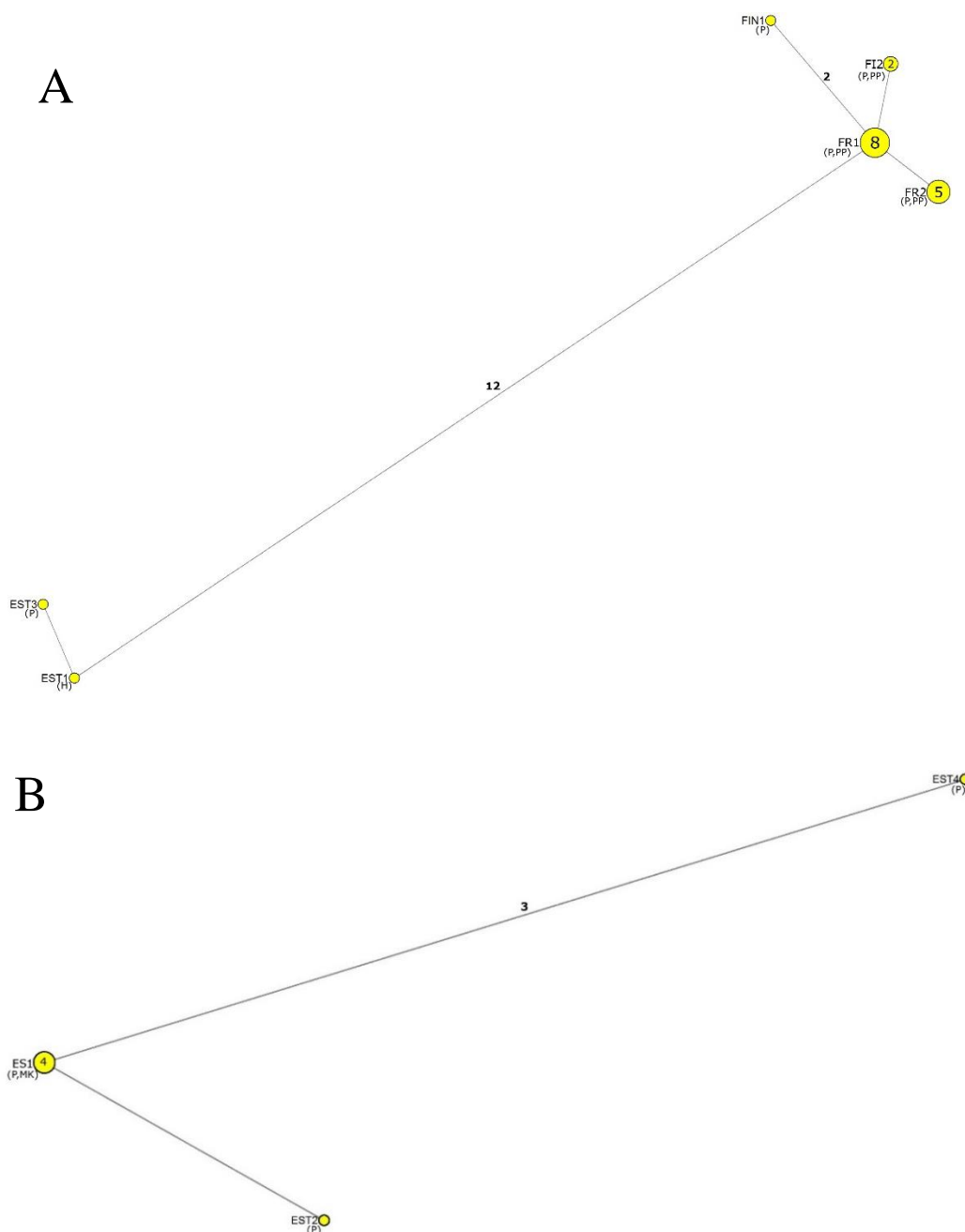
G6 genotüüpi kuuluvad 15 proovi, mis moodustavad 6 haplotüüpi. Esineb üks suurem haplotüüp SU2, kuhu kuulub 9 proovi Sudaanist. G6 genotüübi hulka kuuluvad kõik Sudaani proovid ning ka KEN1 proov Keeniast, mis geneetiliselt suhteliselt lähedane Sudaani proovidele. G7 genotüüpi kuuluvad 7 proovi, mis moodustavad 6 haplotüüpi. Ühte haplotüüpi kuulub kaks Itaalia proovi (haplotüübi tähistusele vastavaid proovide nimetusi vt Lisad, Tabel S1). Suhteliselt kaugemale jääb G7 genotüübi puhul proov GRE2 Kreekast.



Joonis 11. Genotüüpide G6 ja G7 fülogeneetiline võrgustik. Haplotüüpe ning -gruppe ühendavatel joontel kujutatud arvud tähistavad mutatsioonide arvu. Haplotüüpe sees olevad arvud tähistavad sinna kuuluvate proovide hulka. Sulgudes on toodud proovile vastav peremees: L – lammas, V – veis, S – siga, K – kits, KA – kaamel. Tabel haplotüüpide ning -gruppide tähistustele vastavate proovidega koos infoga peremehe, organi ning proovi asukoha kohta vt Lisad, Tabel S1. Kaart proovide nimetuste ning täpsete asukohtadega vt Joonis 8 ja 9.

3.3.1.2 Genotüüpide G8 ja G10 fülogeneetiline võrgustik

Analüüsima G10 ning G8 genotüüpide sisest variatsiooni, koostati kõne all olevate tüvede jaoks eraldi fülogeneetilised võrgustikud (vt Joonis 12).

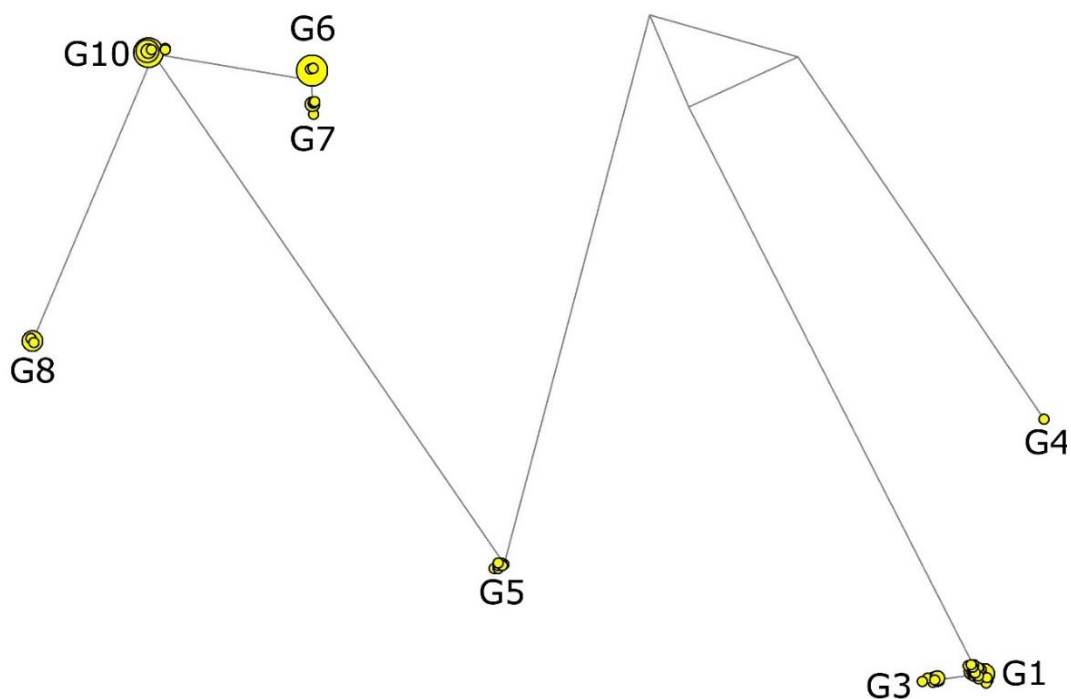


Joonis 12. Genotüübi G10 (A) ja G8 (B) fülogeneetilised võrgustikud. Haplotüüpe- ning grappe ühendavatel joontel kujutatud arvud tähistavad mutatsioonide arvu. Haplotüüpide sees olevad arvud tähistavad sinna kuuluvate proovide hulka. Sulgudes on toodud proovile vastav peremees: P – põder, H- hunt, PP – põhjapõder, MK - metskits. Tabel haplotüüpide ning –gruppide tähistustele vastavate proovidega koos infoga peremehe, organi ning proovi asukoha kohta vt Lisad, Tabel S1. Kaart proovide nimetuste ning täpsete asukohtadega vt Joonis 8.

Genotüüpi G10 kuuluvad 18 proovi, mis moodusavad 6 haplotüüpi. Soomest ning Venemaalt pärit proovid haplotüübinimedega FIN1, FI2, FR1 ning FR2, on selgelt eristunud Eesti proovidest EST3 ning EST1. Genotüüpi G8 kuuluvad 6 proovi Eestist, mis moodustavad 3 haplotüüpi nimedega ES1, EST2 ning EST4.

3.4 Genotüüpide G1, G3, G4-G8 ja G10 fülogeneetiline võrgustik

Saamaks ülevaadet genotüüpide vahelistest kaugustest ning üksteise suhtes paiknemisest, võttes analüüsi ka genotüübid G4 ning G5, koostati fülogeneetiline võrgustik kõikide analüüsiks olevate genotüüpide põhjal (vt Joonis 13). Genotüübi G5 proovide järjestused on saadud Teivi Laurimäe magistritööst.

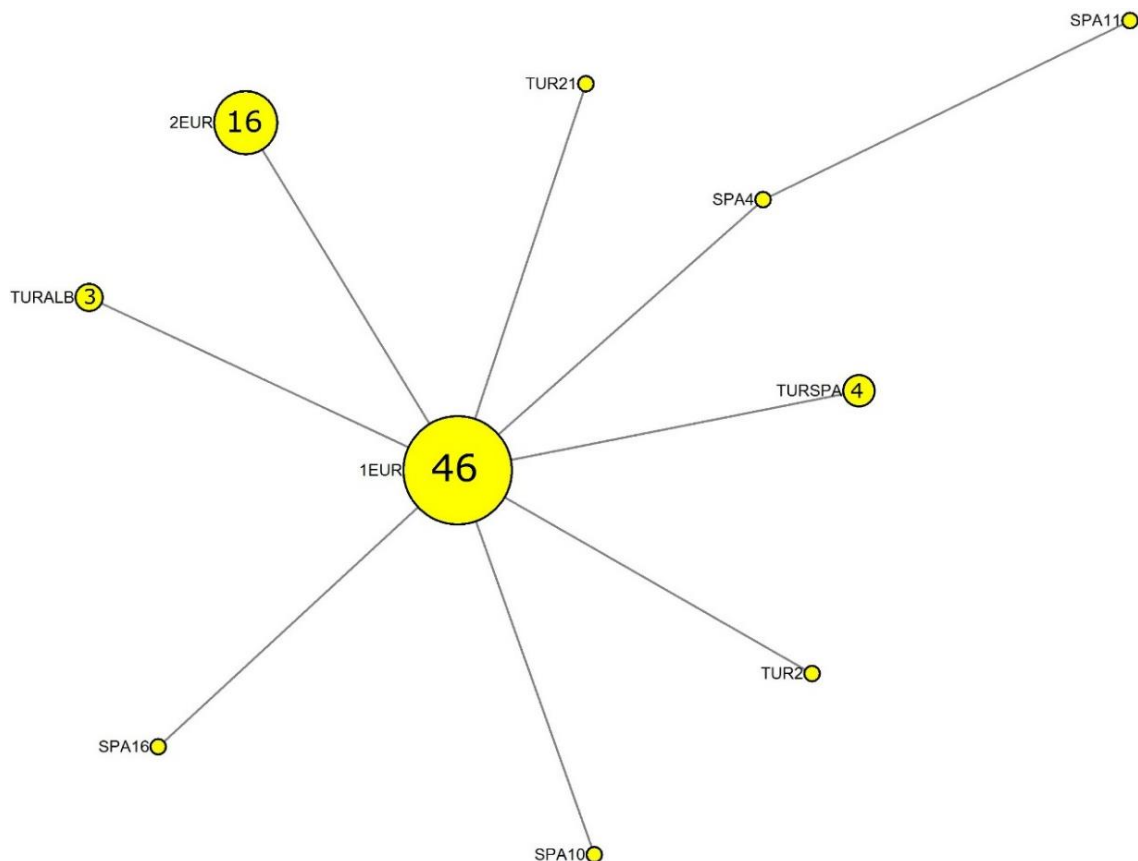


Joonis 13. Genotüüpide G1, G3-G8 ning G10 fülogeneetiline võrgustik.

3.5 NAD1 geenifragmendi põhjal tehtud fülogeneetilised võrgustikud

3.5.1 Genotüübid G1 ja G3

75 proovist, mis olid eelnevalt määratud genotüüpideks G1 ning G3, koostati NAD1 geenifragmendi põhjal fülogeneetiline võrgustik, võrdlemaks lahutusvõime erinevust pikemate järjestuste alusel tehtud võrgustikuga (vt Joonis 14).

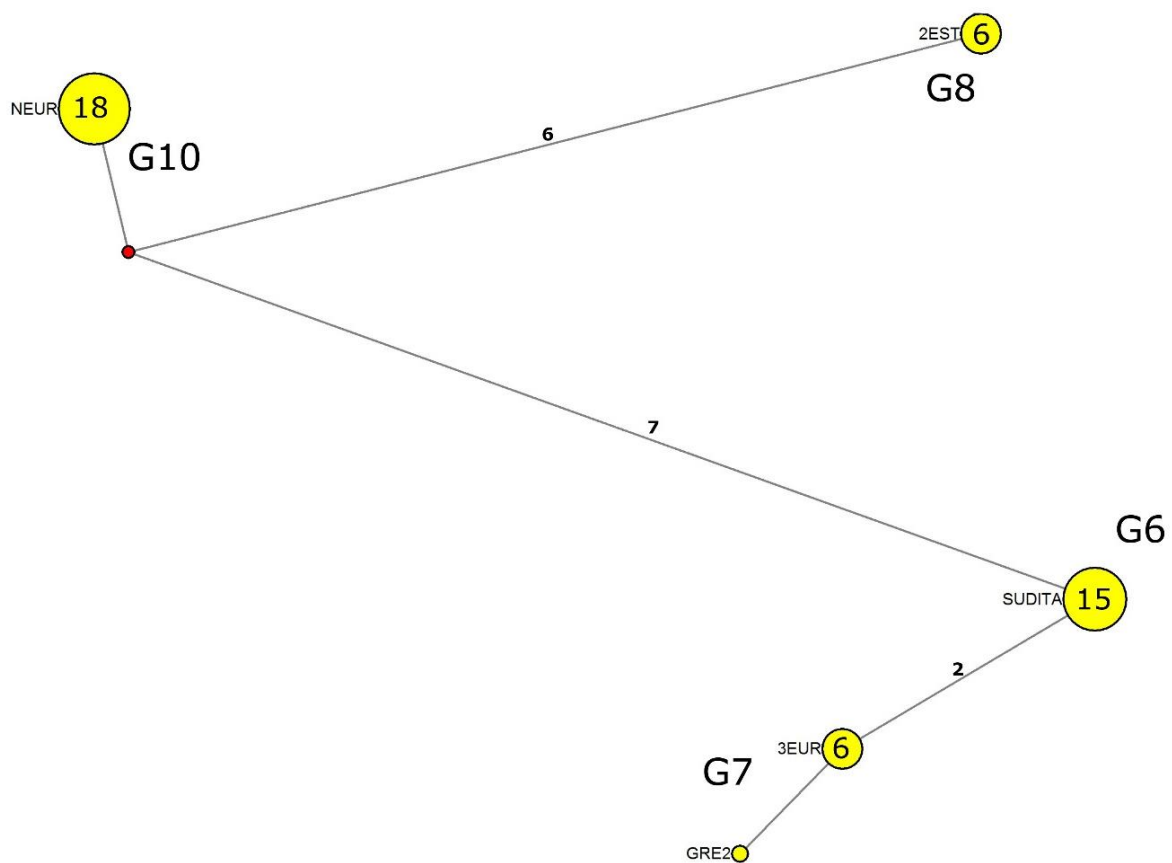


Joonis 14. G1 ning G3 genotüüpide fülogeneetiline võrgustik koostatud NAD1 geeni (343 ap) alusel. Haplotüüpide sees olevad arvud tähistavad sinna kuuluvate proovide hulka.

Moodustus tähekujuline võrgustik, koosnedes 10 haplotüübist. Keskseks haplotüübiks on grupp, kuhu kuuluvad 46 proovi nii Türgist, Hispaaniast, Itaaliast, Soomest kui ka Rumeeniast. Teise suuremasse haplotüüpi, nimega 2EUR, kuuluvad 16 proovi Slovakiast, Itaaliast, Soomest, Türgist, Hispaaniast ja Albaaniast. Võrgustikul ei eristu genotüübid G1 ning G3 teineteisest.

3.5.2 Genotüübid G6-G8 ja G10

46 proovist, mis olid eelnevalt määratud genotüüpideks G6, G7, G8 ning G10, koostati NAD1 geenifragmendi alusel fülogeneetiline võrgustik, et võrrelda lahutusvõime erinevust pikemate järjestuste alusel tehtud võrgustikuga (vt Joonis 15). Eristatavad on genotüübid G6-G8 ning G10, kuid mitte genotüüpidesisesed haplotüübid ega -grupid.



Joonis 15. G6-G8 ning G10 genotüüpide fülogeneetiline võrgustik koostatud NAD1 geeni (343 ap) alusel. Haplotüüpide sees olevad arvud tähistavad sinna kuuluvate proovide hulka.

4. Arutelu

4.1 Töö olulisus ning hinnang valimile

Antud töö hõlmas põistang-paelussi geneetilise mitmekesisuse ja fülogeograafia uurimiseks Euroopat ja osa Aafrikast, mis on siiani geograafiliselt kõige laiaulatuslikum töö selle parasiidi kohta, varasemad uurimused on käsitlenud vaid üksikuid piirkondi. Edaspidi oleks oluline kaasata uurimusse veelgi enam proove nii Euroopas kui Aafrikast, et veelgi tugevdada üldpilti. Käesolev töö on aga oluline andmaks esialgset geograafiliselt laiemat ülevaadet põistang-paeluss geneetilise mitmekesisuse ja fülogeograafia kohta Euroopas ning vähemal määral ka Aafrikas, mis on siiani väheuuritud teema.

4.1.1 Euroopa

On teada, et Euroopas on tsüstiline ehhinokokoos kõige endeemilisemaks Vahemere regioonis, eriti Itaalias, Kreekas, Türgis ning Hispaanias (McManus et al, 2003). Kõikidest mainitud riikidest on ka käesolevas töös proove, eriti arvukalt Hispaaniast ning Türgist. Samuti on teada, et Põhja-Euroopa riikides on parasiidil teadaolevalt levinud peamiselt metsloomatsükkel, mujal Euroopas peamiselt koduloomatsükkel - ka käesolevas töös ilmneb samasugune muster. Varasema kirjanduse põhjal on teada, et Euroopas on kõige laiema levikuga genotüüp G1, ka käesolevas töös oli G1 genotüüp kõige arvukam. Samuti on varasemalt leitud, et Kesk-Euroopas on laialt levinud G7 genotüüp (Kedra et al, 1999; Bart et al, 2006). Siin töös on Kesk-Euroopast G7-ks määratud üksikud proovid Ukrainast ning Rumeeniast. Teisi genotüüpe ei ole peetud Euroopas laialt levinuteks. Käesolevas töös leiti üllatavalt palju genotüüpi G3, mille põhjuseks võib olla see, et seni ei ole tihti suudetud geneetiliselt eristada G1 ning G3 genotüüpe ning tegelikult võib olla G3 genotüübi esinemine Euroopas palju laialdasem kui seni arvatud. Senise kirjanduse põhjal on lamba genotüüpi G1 Euroopast leitud sigadelt, inimestelt, veistelt, koertelt, huntidelt, lammastelt, kitsedelt, vesipühvlitelt ning šaakalilt (Gonzales et al, 2002; Breyer et al, 2004; Capuano et al, 2006; Schneider, 2010; Xhaxhiu, 2011). Siin töös on nendest peremeesliikidest G1 genotüübiga nakatunud lambad, veised, kitsed, inimesed ja sead. Peamiselt tuleks valimit suurendada lõpp-peremeeste koera, hundi ning šaakali näol. G3 genotüüpi on Euroopas leitud veistelt, vesipühvlitelt, lammastelt, inimestelt, käesolevas töös on kajastatud nendest peremeestest veis, lammas, siga ning inimene (Capuano et al, 2006; Busi et al, 2007). Kuna G3 genotüübi peamiseks peremeesliigiks peetakse vesipühvlit, oleks

järgnevateks analüüsideks oluline saada proove ka neilt. Huvitav leid on käesolevas töös G3 genotüübiga nakatunud siga, mida ei ole varem Euroopast kirjeldatud. G4, G5 ega G6 genotüübid ei ole Euroopas laialt levinud. On teada, et G4 genotüüpi esineb vähesel määral Lääne-Euroopas, G5 on leitud vaid üksikutelt veistelt Itaaliast ning Šveitsist ning G6 genotüübiga on leitud ka üks nakatunud inimene Austriast, tegemist olid patsiendiga Ghanast (Bart et al, 2004; Casulli et al, 2008; Schneider, 2010). Ka siin töös on genotüübiks G4 määratud vaid üks proov Hollandist, genotüüpe G5 ega G6 Euroopas aga ei esinenud. G8 ning G10 genotüüpe on leitud Eestist, Soomest, Rootsist, Venemaalt põtradelt, põhjapõtradelt, hundilt, sarnane levik ning peremeesliikide ring on ka esindatud ka siin töös (Moks et al, 2006 & 2008; Lavikainen et al, 2006). Võib öelda, käesolevas analüüsis on seni Euroopas kirjeldatud genotüüpide levik ning peremeesorganismide ring väga sarnaselt esindatud.

4.1.2 Aafrika

Olemasoleva kirjanduse põhjal peetakse Aafrikas kõige levinumateks genotüüpideks G1 ning G6, kõige endeemilisemateks piirkondadeks peetakse Põhja- ning Ida-Aafrika. Mõlemad genotüübid esinevad kontinendil sümpatriliselt ning omavad sarnast peremeesorganismide ringi, kelleks on peamiselt kaamelid, veised, koerad ja lambad, aga ka inimesed. G4 ning G5 genotüüpe on leitud vaid üksikutel juhtudel, kuid genotüüpe G7, G8 ega G10 ei ole Aafrikast leitud. Kuigi valim Aafrikast ei ole käesolevas töös suur, on esindatud G6 kui üks levinumatest genotüüpidest, peremeesorganismidel kaamelitel, veistel, kitsedel, lammastel ja inimesel ning seda kahes endeemilisemas riigis, Sudaanis ning Keenias (Bardonnet et al, 2002; Dinkel et al, 2004; Abushhewa et al, 2010; Casulli et al, 2010; Dakkak et al, 2010; Hailemariam et al, 2012). Aafrika kohta parema ülevaate saamiseks oleks vaja edaspidi sealt koguda proove geograafiliselt märksa laiemalt. Käesoleva töö põhirõhk on siiski Euroopal.

4.2 Pikemate mtDNA järjestuste parem lahutusvõime

Eelnevad uurimustööd, mis uurivad põistang-paelussi geneetilist mitmekesisust, on kasutanud analüüsis lühikesi mtDNA järjestusi, tavaliselt on analüüsi kaasatud 1-2 geeni või selle fragmenti (reeglina 300-500 ap). Mitmed analüüsid on seni läbi viidud NAD1 geenifragmendi põhjal (Turcekova et al, 2003; Schneider et al, 2008 & 2010; Blutke et al, 2010; Sadjjadi et al, 2013). On aga teada, et lühemad järjestused ei pruugi anda piisavat lahutusvõimet mõistmaks parasiidi geneetilist varieeruvust.

Antud töö tulemused kinnitavad, et pikemate järjestuste analüüs annab märkimisväärselt rohkem infot geneetilise varieeruvuse kohta, kuna fülogeneetiliste võrgustike lahutusvõime paranes oluliselt. Käesolevas töös kasutatud järjestuste alusel eristuvad genotüübid G1 ning G3 selgelt üksteisest ning mõlema genotüübi siseselt ilmneb samuti suur geneetiline mitmekesisus. NAD1 geenifragmendi alusel tehtud võrgustikul ei olnud aga võimalik kõnealuseid genotüüpe eristada (vt Joonised 5-7 ja 10), rääkimata genotüübisisesest varieeruvuse esile toomisest. Samas oli G6-G10 genotüüpide puhul nii antud töös kasutatud järjestuse kui ka NAD1 geenifragmendi põhjal koostatud võrgustikel võimalik eristada vastavaid genotüüpe, kuid võrreldes pikema järjestuse alusel tehtud võrgustikuga, ei ilmnenu NAD1 geenijärjestuse alusel genotüüpide siseseid haplotüüpe ega –grupe (vt Joonised 10-12 ja 15). Samuti ei näidanud lühema järjestuse alusel tehtud võrgustik genotüüpide G6-G10 vahelisi kaugusi proportsionaalselt õigesti. Kui üksiku geeni alusel koostatud võrgustik näitas genotüüpide G8 ning G10 vahel 6 mutatsiooni ning G10 ning G6 vahel 7, siis pikema järjestuse alusel eristusid genotüübid G8 ning G10 221 mutatsiooni võrra ning G10 G6-st ning G7-st 133 mutatsiooni võrra. Tulemused näitavad nii põistang-paelussi taksonoomia kui ka mitmekesisuse analüüsi seisukohast vajadust kasutada analüüsis pikemaid järjestusi, kui seda siia maani tehtud on.

4.3 Genotüüpide kladidesisene eristamine ning selle olulisus

On leitud, et kõige sagedamini tekitavad tsüstilist ehinokokoosi inimesel genotüübid G1 ning G6 (McManus et al, 1994; Rojas et al, 2014). Just nende kahe genotüübi puhul ei ole jõutud selgusele, kas nende eristamine eraldi genotüüpideks, vastavalt kladides G1-G3 ning G6/G7, on põhjendatud. Käesolev töö aga demonstreerib mõlema genotüübi selget eristumist neile lähedastest genotüüpidest.

Klaadi *E. granulosus sensu stricto* kuuluvad genotüübid G1 ning G3 on antud töö põhjal küll suhteliselt lähedased, kuid siiski üksteisest hästi eristatavad. On pakutud, et G1-G3 klaadi eristamine eraldi genotüüpideks ei ole vajalik, kuna mitmetes läbi viidud uurimustöodes, ei ole suudetud neid geneetiliselt eristada (Vural et al 2008; Abusshewa et al, 2010; Nakao et al, 2013). On ka välja pakutud, et sobivam oleks pidada neid eri genotüüpide asemel eri haplotüüpideks (Nakao et al, 2013). Kuna genotüüp G1 on peamiseks tsüstilise ehinokokoosi tekitajaks inimesel on alust arvata, et genotüüp G1 erineb G3-st nakatamisvõime osas, eriti, kuna genotüübid esinevad sümpatriliselt ning omavad sarnast peremeesorganismide ringi (Rojas et al, 2014). Seega on nende genotüüpide eristamine olulise tähtsusega. Järgnevateks

analüüsideks oleks vajalik kaasata analüüsi ka vähearvukas genotüüp G2, mida on peetud ka G1 või G3 genotüübi mikrovariandiks (Vural et al, 2008; Rojas et al, 2014), et saada täiendavat informatsiooni *E. granulosus* s.s. klaadi olemuse kohta.

Ka genotüüpide G6-G8 ning G10 taksonoomia ning eristamise osas ei ole selgusele jõutud (Nakao et al, 2013; Rojas et al, 2014). Genotüübid G6, G7, G8 ning G10 olid käesolevast töös selgelt eristatavad. G6 ning G7 genotüüpide üksteisest eristamist eri tüvedeks on samuti peetud põhjendamatuks, kuna paljude uurimustööde puhul ei ole olnud võimalik genotüüpe eristada (Mogoye et al, 2013; Nakao et al, 2013; Rojas et al, 2014). Antud töös eristub aga genotüüp G6 selgelt genotüübist G7. Huvitav on asjaolu, et G6 ning G7 genotüüpide levik ning peremeesloomade ring on väga erinevad, G6 on levinud eelkõige Aafrikas ning Lõuna-Euroopas, nakatades põhiliselt kaameleid, G7 aga Kesk-Euroopas nakatades põhiliselt sigu, kuid geneetiliselt on tüved ka käesoleva töö põhjal küll selgelt eristuvad, kuid siiski lähedased.

On pakutud välja käsitleda G8 eraldi liigina genotüüpidest/klastrist G6-G7,G10 (Nakao et al, 2013; Rojas et al, 2014). Ka käesolevas töös paigutus genotüüp G8 genotüüpidest G6, G10 ning G7 märkimisväärselt kaugemale. See on aga üllatav, kuna G10 ning G8 esinevad sümpatriliselt ning neil on väga sarnane peremeesorganismide ring. G8 ning G10 erisuste võimalikuks väljaselgitamiseks Euroopas, oleks tarvis järgnevasse analüüsidesse hõlmata proove Põhja-Ameerikast, kus on samuti G8 ning G10 genotüüpe leitud (Lavikainen et al, 2003; Macpherson ja Torgenson, 2013).

On leitud, et eri genotüüpidel on eri haiguskulg, mis viitab ka erineva ravi vajadusele. On ka välja pakutud vajadust genotüübi-spetsiifiliste vaktsiinide järele (Rojas et al, 2014). Seega on genotüüpide eristamine ning õigesti määramine oluline, kuna ekslikult määratud genotüüp võib põhjustada vale ravi määramise. Genotüüpide eristamiseks tuleks aga kasutada analüüsil pikemaid järjestusi, kui 1-2 geenifragmenti, kuid edasiste analüüsides käigus oleks tarvis välja selgitada, kas esinevad sellised lühemad piirkonnad genoomis, mille põhjal saab genotüüpe eristada.

4.4 Genotüüpidesisene mitmekesisus ning fülogeograafia

Nii genotüübi G1 kui ka G3 puhul olid proovid geneetiliselt väga varieeruvad, kuid piirkonniti segunenud. Mõningane grupeerumine riigi järgi ilmnis küll Türgi ning Hispaania proovide puhul, kuid kuna need olid riigid, kust proove oli kõige rohkem, on nende puhul ka tõenäosus

suurem, et mingi osa proove grupeeruvad kokku. Võib öelda, et G1 ega G3 genotüüpide puhul ei ole antud valmi korral geograafiliselt lähedamal asuvad proovid märkimisväärselt sarnased geneetiliselt.

Proovid genotüübist G6 olid geneetiliselt suhteliselt sarnased. Antud valimi puhul ei saa küll võrrelda genotüübi geneetilist mitmekesisust eri riikide vahel, kuna proove oli peamiselt vaid Sudaanist, kuid kuna proovid olid riigi eri piirkondades, saab öelda, et Sudaanis ei ole G6 genotüüp geneetiliselt väga mitmekesine. Selle väljaselgitamiseks, kas G6 genotüübi sees esinebki pigem vähene geneetiline mitmekesisus, välja selgitamiseks, tuleks kindlasti suurenda valimit Aafrikas ning ka Euroopas.

G7 genotüübi puhul esines eri proovide vahel suurem variatsioon, kui seda esines G6 genotüübi siseselt. Käesolevas töös määratleti G7 genotüübiks küll proovid väga mitmetest riikidest, kuid vastavatest piirkondadest oli vaid üksikuid proove, mis ei anna veel täit ülevaadet geneetilisest mitmekesisusest geograafilises kontekstis. Esialgsete andmete põhjal võib aga öelda, et G7 genotüüp on pigem geneetiliselt suhteliselt varieeruv. Genotüüpi G8 kuulusid 6 proovi Eestist, mis olid geneetiliselt suhteliselt lähedased. G10 genotüübi puhul olid erinevatest geograafilistest piirkondadest proovid geneetiliselt erinevad. Eesti proovid olid eristunud Soome ning Venemaa proovidest, samas Soome ja Venemaa proovid olid geneetiliselt sarnased.

Parasiitide fülogeograafiliste mustrite kujunemisel on olulisel kohal peremeesorganismide levik. Kuna põistang-paeluss nakatab aga märkimisväärselt palju koduloomi, on parasiidi levikut ning ka geneetilist mustrit suurel määral kujundanud inimene, seda eelkõige intensiivse loomakaubanduse näol (Knapp et al, 2011), mis vähendab eri piirkondade populatsioonidevahelist geneetilist mitmekesisust. Genotüüpide puhul, mis nakatavad eelkõige koduloomi, võiks eeldada suuremat geneetilist mitmekesisust, kuid vähemat eristumist piirkondade vahel, võrreldes peamiselt metsloomatsükliga levivate genotüüpidega. Seda hüpoteesi toetab ka käesolev töö: Põhja-Euroopas metsloomatsükliga ringleva genotüübi G10 puhul olid geograafiliselt eristunud proovid grupeerunud, koduloomatsükliga levivate genotüüpide G1, G3, G7 puhul ilmnes aga väiksem geneetiline erinevus eri piirkondade vahel ning suur genotüübisine variatsioon.

Kokkuvõte

Põistang-paeluss (*Echinococcus granulosus*) on maailmas laialt levinud parasiit, kes tekitab erinevatel mets- ning koduloomadel, aga ka inimesel, eluohtlikku haigust tsüstilist ehhinokokoosi. Haigus esineb laialdaselt nii Euroopas kui ka Aafrikas.

Käesolevas töös analüüsiti mitokondriaalse DNA alusel põistang-paelussi geneetilist mitmekesisust ning fülogeograafiat, hõlmates mitmeid riike nii Euroopast kui ka Aafrikast ning kasutades analüüsis 7188 aluspaari pikkust mtDNA järjestust, mis on seni kõige ulatuslikum põistang-paelussi geneetilist mitmekesisust ning fülogeograafiat käsitlev töö, nii geograafiliselt kui ka analüüsi kaasatud järjestuste pikkuste osas. Eelnevalt on analüüsides piirdutud üksikute riikide analüüsiga 1-2 geeni või selle fragmendi (reeglina 300-500 ap) alusel.

Töö eesmärgiks oli analüüsida, kas oluliselt pikemad järjestused annavad märkimisväärselt parema lahutusvõime fülogeneetilistel võrgustikel, võimaldades ka siamaani tihti kooskäsitletud lähedasi genotüüpe paremini eristada. Samuti anda ülevaade põistang-paelussi geneetilisest mitmekesisusest geograafilises kontekstis.

Tulemused näitasid, et antud töös kasutatud oluliselt pikemad genoomijärjestused, andsid ka oluliselt parema lahutusvõime fülogeneetilistel võrgustikel, pikemad mitogenoomi järjestused võimaldasid ka selget eristamist lähedas suguluses olevate genotüüpide G1, G3 ning G6, G7 vahel. Kuna on teada, et eri genotüüpidel on erinev nakkusvõime ning haiguskulg, on oluline genotüüpe õigesti määrata. Sellest järeldeb vajadus nii põistang-paelussi taksonoomia kui ka mitmekesisuse analüüsi seisukohast kasutada analüüsides pikemaid järjestusi, kui seda siamaani tehtud on. Käesolev uurimustöö näitas põistang-paelussi äärmiselt mitmekesist geneetilist struktuuri ning geneetiliselt lähedased haplotüübid olid üldiselt ka geograafiliselt lähedased. Samas ei ilmnenud muster tihti koduloomade puhul, mille põhjuseks on ilmselt intensiivne loomakaubandus, mis aitab kaasa parasiidi kiirele levikule.

Järgnevateks analüüsideks on plaanis suurendada valimit nii Euroopas kui ka Aafrikas, et veelgi tugevdada üldpilti. Käesolev töö on aga oluline andmaks esialgset ülevaadet põistang-paelussi geneetilise mitmekesisuse ning fülogeograafia kohta Euroopas ning Aafrikas.

Summary

Genotypic differentiation and phylogeography of *Echinococcus granulosus* in Europe.

Liina Kinkar

Echinococcus granulosus is a widely distributed parasite that causes life-threatening illness cystic echinococcosis in a wide spectra of wild and domesticated animals and also humans. The disease is highly prevalent both in Europe and Africa.

The current thesis analyzed the genetic variability and phylogeography of *E. granulosus* in a number of European and African countries, using 7188 basepairs (bp) of mitochondrial DNA (mtDNA), which is the most comprehensive study so far on the topic, both geographically and regarding the length of mtDNA. Previous analyses have been conducted usually in single countries, using 1-2 genes or its fragments (~300-500 bp).

The aim of this study was to analyze whether using longer mtDNA sequences can give remarkably better resolution for phygenetic networks, enabling also clear differentiation of closely related genotypes that have been often thought to be indistinguishable. The aim was also to give an overview of *E. granulosus* genetic variability in geographical context.

The results show that analysis of longer mtDNA sequence analysis provide indeed better resolution for phylogenetic networks, enabling also clear differentiation of closely related genotypes G1, G3 and G6, G7. As genotypes differ in pathogenity and course of disease, genotype differentiation is of utmost importance. This highlights the necessity of using longer mtDNA sequences in analysis than previously, regarding both *E. granulosus* taxonomy and genetic variability. The current thesis demonstrated high genetic variability of *E. granulosus* and genetically closely related haplotypes were usually found to be closest also geographically. However, sometimes this 'rule' was also violated, most likely due to intensive animal trade, that contributes greatly to rapid spread of the parasite.

To further extend the knowledge on the topic, it is important to increase the number of samples both from Europe and Africa. The current thesis is important to give first insight into the genetic variability and phylogeography of *E. granulosus* in Europe and Africa.

Tänuavaldused

Avaldan sügavat tänu Urmas Saarmale käesoleva magistritöö juhendamise eest, kelle abivalmidus ning väärtuslikud nõuanded olid töö valmimisel asendamatud.

Samuti tänan südamest Teivi Laurimäed meeldiva koostöö eest, muutes pikad laboripäevad alati toredaks.

Lisaks sooviksin tänada koostööpartnereid A. Casulli, G. Cringoli, H.-L. Gonzales, A. Lavikainen, T. Romig, R. A. Omer, F. Ponce, S. Rehbein, S. Simsek, V. Snabel, H. Sprong ning V. Varcasia.

Kasutatud kirjandus

- Abushhewa M H, Abushhiwa M H, Nolan M J, Jex A R, Campbell B E, Jabbar A, Gasser R B (2010) Genetic classification of *Echinococcus granulosus* cysts from humans, cattle and camels in Libya using mutation scanning-based analysis of mitochondrial loci. *Molecular and Cellular Probes* 24: 346–351.
- Bardonnet K, Piarroux R, Dia L, Schneegans F, Beurdeley A, Godot V, Vuitton D A (2002) Combined eco-epidemiological and molecular biology approaches to assess *Echinococcus granulosus* transmission to humans in Mauritania: occurrence of the ‘camel’ strain and human cystic echinococcosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 383-386.
- Bart J-M, Bardonnet K, Elfegoun M C B, Dumon H, Dia L, Vuitton A, Piarroux R (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 128: 229-234.
- Bart J M, Morariu S, Knapp J, Ilie M S, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I, Piarroux R (2006) Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitology Research* 98; 130-137.
- Batelli G (2009) Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Veterinary Research Communications* 1: 47-52.
- Blutke A, Hamel D, Hüttner M, Gehlen H, Romig T, Pfister K, Hermanns W (2010) Cystic echinococcosis due to *Echinococcus equinus* in a horse from southern Germany. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22: 458-462.
- Breyer I, Georgieva D, Kudrova R, Gottstein B (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitology Research* 93: 127-130.
- Brown W M, George M, Wilson A C (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Acedemy of Sciences* 76.

- Busi M, Snabel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S (2007) Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Veterinary Parasitology* 150: 75–83.
- Capuano F, Rinaldi L, Maurelli M P, Perugini A G, Veneziano V, Garippa G, Genchi C, Musella V, Cringoli G (2006) Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains. *Veterinary Parasitology* 137: 262-268.
- Castro J A, Picornell A, Ramon M (1998) Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *International Microbiology* 1: 327-332.
- Casulli A, Manfredi M T, La Rosa G, Di Cerbo A R, Genchi C, Pozio E (2008) *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Veterinary Parasitology* 155: 168-172.
- Casulli A, Zeyhle E, Brunetti E, Pozio E, Meroni V, Genco F, Filice C (2010) Molecular evidence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in humans from Turkana, Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104: 29-32.
- Dakkak A (2010) Echinococcosis/hydatidosis: a severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology* 174: 2-11.
- Dinkel A, Njoroge E M, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E, Elmahdi I E, Mackenstedt E, Romig T (2004) A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *International Journal for Parasitology* 34: 645-653.
- Eckert J, Deplazes P, Craig P, Gemmell M A, Gottstein B, Heath D, Jenkins D J, Kamiya M, Lightowlers M (2001) Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X, Pawlowski ZS, editors. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern* 73-100.

- Eckert J, Deplazes P (2004) Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 107-135.
- Gonzalez L M, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit M C, McManus D P, Gárate T, Cuesta-Bandera (2002) Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Experimental Parasitology* 102: 46-56.
- Hailermariam Z, Nakao M, Menkir S, Lavikainen A, Yanagida T, Okamoto M, Ito A (2012) Molecular identification of unilocular hydatid cysts from domestic ungulates in Ethiopia: Implications for human infections. *Parasitology International* 61: 375-377.
- Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker J D F, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A (2008) Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 (Cestoda : Taeniidae) from the African lion. *International Journal for Parasitology* 38: 861-868.
- Hüttner M, Romig T (2009) *Echinococcus* species in African wildlife. *Parasitology* 136: 1089-1095.
- Knapp J, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Saarma U, Lavikainen A, Ito A (2011) Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 628-638.
- Lavikainen A, Lehtinen M J, Meri T, Hirvelä-Koski V, Meri S (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotype group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127: 207-215.
- Macpherson C N L, Meslin F X, Wandeler A I (2013) *Dogs, Zoonoses and Public Health*. CABI: 168.
- McManus D P, Ding Z, Bowles J (1994) A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Acta Tropica* 56: 7-14.
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley P B (2003) Echinococcosis. *The Lancet* 362: 1295–1304.

- McManus D P, Thompson R C (2003) Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127: 37-51.
- Mogoye B K, Menezes C N, Wong M L, Stacey S, Delft D, Wahlers K, Wassermann M, Romig T, Kern P, Grobusch M P, Frean J (2013) First insights into species and genotypes of *Echinococcus* in South Africa. *Veterinary Parasitology* 196: 427–432.
- Moks E, Jõgisalu I, Saarma U, Talvik H, Järvis T, Valdmann H (2006) Helminthologic survey of the wolf (*Canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 359-365.
- Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U (2008) First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of genotypes G5-G10. *Parasitology* 135: 647-654.
- Moro P, Schantz P M (2009) Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 13: 125-33.
- Nakao M, McManus D P, Schantz P M, Craig P S, Ito A (2007) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134: 713-722.
- Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A (2013) Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal of Parasitology* 43: 1017-1029.
- Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, Aspöck H, Auer H (2004) *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 128: 569-575.
- Rojas C A, Romig T, Lightowers M W (2014) *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans-review of current knowledge. *International Journal of Parasitology* 44: 9-18.

- Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, Gonzalez L M, Ferrer E, Garate T, Rinaldi L, Maravilla P (2009) A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology* 136: 317-328.
- Sadjjadi S M, Mikaeili F, Karamian M, Maraghi S, Sadjjadi F S, Shariat-Torbaghan S, Kia E B (2013) Evidence that the *Echinococcus granulosus* G6 genotype has an affinity for the brain in humans. *International Journal of Parasitology* 43: 875– 877.
- Schneider R, Gollackner B, Edel B, Schmid K, Wrba F, Tucek G, Walochnik J, Auer H (2008) Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *International Journal of Parasitology* 38: 1065–1071.
- Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H (2010) *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 871–874.
- Schwartz M, Vissing J (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine* 347: 576–80.
- Thompson R C A (2008) The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology* 119: 439-446.
- Turcekova L, Snabel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinsky P (2003) Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica* 85: 223-229.
- Varcasia A, Garippa G, Pipia A P, Scala A, Brianti E, Giannetto S, Battelli G, Poglayen G, Micagni G (2008) Cystic echinococcosis in equids in Italy. *Parasitology Research* 102: 815-818.
- Vural G, Baca A U, Gauci C G, Bagci O, Gicik Y, Lightowlers M W (2008) Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1–G3 genotype cluster. *Veterinary Parasitology* 154: 347–350.

- Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, Kondi E, Postoli R, Rinaldi L, Dimitrova Z M, Visser M, Knaus M, Rehbein S (2011) Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitology Research* 108: 341–353.
- Xiao N, Qiu J M, Nakao M, Li T Y, Yang W, Chen X W, Schantz P M, Craig P S, Ito A (2005) *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitology International* 55: 233-236.
- Yang Y R, Rosenzvit M C, Zhang L H, Zhang J Z, McManus D P (2005) Molecular study of *Echinococcus* in west-central China. *Parasitology* 131: 547-555.

Internetiallikad:

1. The Centre for Food Security and Public Health (2009) Echinococcosis. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>

Lisad

Tabel S1. Proovide analüüsi- ning laborikoodid, fülogeneetilistel võrgustikel olevate haplotüüpide nimed ning info päritolu, peremeeslooma, nakatunud organi ning genotüübilise kuuluvuse kohta.

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud	Meie määratud
A. Casulli	ITA1	-	AC1	Veis	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	G1
A. Casulli	ITA2	IT1	AC2	Lammas	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	G1
A. Casulli	ITA3	IT2	AC3	Lammas	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	G1
A. Casulli	ITA4	IT2	AC4	Lammas	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	G1
A. Casulli	ITA5	IT1	AC5	Lammas	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	G1
A. Casulli			AC6	Veis	-	Itaalia, Sitsiilia	G2	-
A. Casulli			AC7	Veis	-	Itaalia, Latium	G3	-
A. Casulli			AC8	Veis	-	Itaalia, Latium	G3	-
A. Casulli			AC9	Veis	-	Itaalia, Umbria	G3	-
A. Casulli			AC10	Veis	-	Itaalia, Latium	G3	-
A. Casulli			AC11	Veis	-	Itaalia, Abruzzo	G1	-
A. Casulli			AC12	Veis	-	Itaalia, Latium	G1	-
A. Casulli			AC13	Veis	-	Itaalia, Veneto	G1	-
A. Casulli			AC14	Veis	-	Itaalia, Latium	G1	-
A. Casulli			AC15	Veis	-	Itaalia, Abruzzo	G1	-
A. Casulli			AC16	Veis	-	Itaalia, Latium	G1	-
A. Casulli			AC17	Veis	-	Itaalia, Latium	G1	-
A. Casulli			AC18	Veis	-	Itaalia, Latium	G1	-
A. Casulli			AC19	Lammas	-	Itaalia, Basilicata	G3	-
A. Casulli			AC20	Veis	-	Itaalia, Lombardy	G5	-
A. Casulli	KEN1	-	CA2	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	G6
A. Casulli			CA3	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	-
A. Casulli			CA4	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	-
A. Casulli			CA5	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	-
A. Casulli			CA7	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	-
A. Casulli			CA8	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	-

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
A. Casulli			CA9	Inimene	-	Keenia, Turkana	G6	-
A. Casulli	ROM2	-	CA10	Lammas	-	Rumeenia	G7	G7
A. Casulli	ROM3	-	CA11	Lammas	-	Rumeenia	G7	G7
G. Cringoli			L1	Vesipühvel	-	-	G1	-
G. Cringoli			L2	Vesipühvel	-	-	G1	-
G. Cringoli			L3	Vesipühvel	-	-	G3	-
G. Cringoli			L4	Vesipühvel	-	-	G3	-
H-L Gonzales	SPA1	-	1G	Siga	Maks	Hispaania	G1	G1
H-L Gonzales	SPA2	-	2G	Inimene	-	Hispaania	G1	G1
H-L Gonzales			4G	Inimene	-	Aafrika	G1	-
H-L Gonzales			7G	Inimene	Maks	Rumeenia	G1	-
H-L Gonzales	SPA3	-	12G	Metssiga	Soolest	Hispaania	G1	G1
A. Lavikainen	FIN1	-	Fin1	Põder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN2	FR1	Fin2	Põder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	SWE1	FR2	Fin3	Põhjapõder	-	Rootsi	G10	G10
A. Lavikainen	FIN4	FI2	Fin4	Põhjapõder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN5	FR1	Fin5	Põder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN6	FR1	Fin6	Põder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN7	FI2	Fin7	Põder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN8	FR1	Fin8	Põhjapõder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN9	FR1	Fin9	Põhjapõder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN10	FR2	Fin10	Põhjapõder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN11	FR1	Fin11	Põhjapõder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen	FIN12	FR1	Fin12	Põhjapõder	-	Soome	G10	G10
A. Lavikainen			NedG5	Veis	-	Holland	G5	-
A. Lavikainen	FIN13	FI1	Fin13	Inimene	-	Soome	G1	G3

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
A. Lavikainen	FIN14	FI1	Fin14	Inimene	-	Soome (nakatunud Ida-Euroopas)	G1	G3
A. Lavikainen	FIN16	-	Fin16	Inimene	-	Soome (patsient Põhja-Aafrikast)	G1	G1
A. Lavikainen	FIN17	-	Fin17	Inimene	-	Soome (patsient Põhja-Aafrikast)	G1	G1
A. Lavikainen	RUS1	FR2	Fin19	Pöder	-	Venemaa, Kargopol, Arkhangelsk	G10	G10
A. Lavikainen	RUS2	FR2	Fin20	Pöder	-	Venemaa, Kargopol, Arkhangelsk	G10	G10
A. Lavikainen	RUS3	FR1	Fin21	Pöder	-	Venemaa, Kargopol, Arkhangelsk	G10	G10
A. Lavikainen	RUS4	FR2	Fin22	Pöder	-	Venemaa, Kargopol, Arkhangelsk	G10	G10
T. Romig, R.A.Omer			TR 1	Kaamel	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 2	Kaamel	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 5	Veis	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 6	Veis	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 7	Lammas	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	-
T. Romig, R.A.Omer	SUD1	-	TR 9	Lammas	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	G6
T. Romig, R.A.Omer			TR 10	Kits	-	Sudaan, Khartoum/Tamboul	-	-
T. Romig, R.A.Omer	SUD2	-	TR 13	Kaamel	-	Sudaan, Nyala	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD3	SU1	TR 14	Kaamel	-	Sudaan, Nyala	-	G6
T. Romig, R.A.Omer			TR 15	Kaamel	-	Sudaan, Nyala	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 16	Veis	-	Sudaan, Nyala	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 17	Veis	-	Sudaan, Nyala	-	-
T. Romig, R.A.Omer			TR 18	Veis	-	Sudaan, Nyala	-	-
T. Romig, R.A.Omer	SUD4	SU2	TR 19	Lammas	-	Sudaan, Nyala	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD5	SU2	TR 20	Lammas	-	Sudaan, Nyala	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD6	-	TR 21	Lammas	-	Sudaan, Nyala	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD7	SU2	TR 22	Kits	-	Sudaan, Nyala	-	G6

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
T. Romig, R.A.Omer			TR 23	Kits	-	Sudaan, Nyala	-	-
T. Romig, R.A.Omer	SUD8	SU1	TR 24	Kits	-	Sudaan, Nyala	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD9	SU2	TR 25	Veis	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD10	SU2	TR 26	Veis	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD11	SU2	TR 27	Veis	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	G6
T. Romig, R.A.Omer			TR 28	Lammas	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	-
T. Romig, R.A.Omer	SUD12	SU2	TR 29	Lammas	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	G6
T. Romig, R.A.Omer	SUD13	SU2	TR 30	Lammas	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	G6
T. Romig, R.A.Omer			TR 32	goat	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	-
T. Romig, R.A.Omer	SUD14	SU2	TR 33	goat	-	Sudaan, Juba/Malkal	-	G6
F. Ponce			P1	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce	SPA4	-	P2	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G1
F. Ponce	SPA5	SP2	P3	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G1
F. Ponce	SPA6	SP2	P4	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G1
F. Ponce	SPA7	-	P5	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G3
F. Ponce			P6	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P7	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce	SPA8	SP1	P8	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	G3
F. Ponce			P9	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P10	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce	SPA9	-	P11	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G3
F. Ponce			P12	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P13	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P14	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce	SPA10	-	P15	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G1

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
F. Ponce	SPA11	-	P16	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G1
F. Ponce			P17	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce	SPA12	-	P18	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	G3
F. Ponce	SPA13	-	P19	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	G3
F. Ponce	SPA14	-	P20	Lammas	Kops	Kesk-Hispaania	G1	G1
F. Ponce			P21	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P22	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce	SPA15	-	P23	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	G1
F. Ponce			P24	Lammas	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P25	Veis	-	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P26	Veis	Kops	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P27	Veis	-	Hispaania, Pamplona	G1	-
F. Ponce			P28	Veis	-	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P29	Veis	-	Hispaania, Toledo	G1	-
F. Ponce			P30	Veis	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P31	Veis	Maks	Kesk-Hispaania	G1	-
F. Ponce			P32	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P33	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P34	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P35	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P36	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P37	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P38	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P39	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P40	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
F. Ponce			P41	Hobune	Maks	Kesk-Hispaania	G4	-
F. Ponce			P42	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	-
F. Ponce			P43	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	-
F. Ponce			P44	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	-
F. Ponce			P45	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	-
F. Ponce			P46	Siga	Kops	Hispaania, Segovia	-	-
F. Ponce	SPA16	-	P47	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	G1
F. Ponce			P48	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	-
F. Ponce	SPA17	SP1	P49	Siga	Kops	Hispaania, Segovia	-	G3
F. Ponce	SPA18	-	P50	Siga	Maks	Hispaania, Segovia	-	G7
F. Ponce	SPA19	SP3	P51	Kits	Kops	Kesk-Hispaania	-	G1
F. Ponce	SPA20	-	P52	Kits	Kops	Kesk-Hispaania	-	G1
F. Ponce	SPA21	SP3	P53	Kits	Kops	Kesk-Hispaania	-	G1
F. Ponce			P54	Kits	Maks	Kesk-Hispaania	-	-
F. Ponce			P55	Kits	Maks	Kesk-Hispaania	-	-
F. Ponce			P56	Kits	Maks	Kesk-Hispaania	-	-
F. Ponce			P57	Inimene	-	Hispaania, Valladolid	-	-
F. Ponce			P58	Inimene	-	Hispaania, Valladolid	-	-
F. Ponce			P59	Inimene	-	Hispaania, Madrid	-	-
F. Ponce			P60	Inimene	-	Hispaania, Madrid	-	-
F. Ponce	SPA22	-	P61	Inimene	Kops	Hispaania, Madrid	-	G1
F. Ponce			P62	Inimene	-	Hispaania, Pamplona	-	-
F. Ponce	SPA23	-	P63	Inimene	-	Hispaania, Soria	-	G3
F. Ponce			P64	Inimene	Neer	Hispaania, Madrid	-	-

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
S. Rehbein	ALB1	-	ALB1	Veis	Kops	Albaania, Lushnje	-	G3
S. Rehbein	ALB2	-	ALB3	Lammas	Kops	Albaania, Tirana	-	G1
S. Rehbein	ALB3	-	ALB4	Lammas	Maks	Albania, Tirana	-	G1
S. Rehbein			ALB5	Lammas	Maks	Albaania, Tirana	-	-
S. Simsek	TUR1	TU1	S 1	Lammas	Kops	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR2	-	S 2	Lammas	Kops	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek			S 3	Veis	Kops	Türgi, Elazig	G1	-
S. Simsek			S 4	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	-
S. Simsek	TUR3	-	S 5	Lammas	Kops	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek			S 6	Lammas	Kops	Türgi, Elazig	G1	-
S. Simsek	TUR4	TU1	S 7	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek			S 8	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	-
S. Simsek	TUR5	TU2	S 9	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek			S 10	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	-	-
S. Simsek	TUR6	TU2	S 11	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR7	TU1	S 12	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR8	-	S 13	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR9	-	S 14	Lammas	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR10	TU2	S 15	Lammas	Kops	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR11	TU2	S 16	Lammas	Kops	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek			S 17	Veis	Kops	Türgi, Elazig	G1	-
S. Simsek			S 18	Lammas	Maks	Turkey, Kirsehir	-	-
S. Simsek	TUR12	-	S 19	Veis	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR13	-	S 20	Veis	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR14	-	S 21	Veis	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
S. Simsek	TUR15	-	S 22	Veis	Kops	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR16	-	S 23	Veis	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR17	TU3	S 24	Veis	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek	TUR18	TU3	S 25	Veis	Maks	Türgi, Elazig	G1	G1
S. Simsek			S 26	Human	Maks	Türgi, Elazig	G7	-
S. Simsek			S 27	Human	Maks	Türgi, Elazig	-	-
S. Simsek			S 28	Human	Maks	Türgi, Elazig	-	-
S. Simsek			S29	Veis	Maks	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR19	-	S30	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S31	Veis	Maks	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR20	-	S32	Veis	Maks	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek	TUR21	-	S33	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek	TUR22	-	S34	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S35	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR23	-	S36	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S37	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S38	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S39	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S40	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S41	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S42	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S43	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S44	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S45	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR25	-	S46	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
S. Simsek			S47	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR26	-	S48	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek	TUR27	-	S49	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek	TUR28	-	S50	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S51	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR29	-	S52	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G3
S. Simsek	TUR30	-	S53	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S54	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR31	-	S55	Veis	Maks	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S56	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S57	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S58	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR32	-	S59	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G3
S. Simsek			S60	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S61	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR33	-	S62	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S63	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S64	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR34	-	S65	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S66	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR35	-	S67	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S68	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR36	-	S69	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G1
S. Simsek			S70	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S71	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
S. Simsek			S72	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S73	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek			S74	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
S. Simsek	TUR37	-	S75	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	G3
S. Simsek			S76	Veis	Kops	Türgi, Erzurum	-	-
V. Snabel			B5	-	-	Ukraina, Krasne, Sumy	G7	-
V. Snabel	UKR1	-	B7	Siga	-	Ukraina, Krasne, Sumy	G7	G7
V. Snabel			B8	-	-	Rumeenia, Romanesti Iasi	G7	-
V. Snabel			B9	-	-	Tumeenia, Tutova-Vaslui	G7	-
V. Snabel			B10	-	-	Poola	G7	-
V. Snabel			B11	-	-	Slovakkia, Komárno	G1	-
V. Snabel	SLO1	-	B12	Siga	-	Slovakkia, Komárno	G7	G3
V. Snabel			B13	-	-	Rumeenia, Tutova-Vaslui	G1	-
H. Sprong			HS1	Siga	-	Holland	G7	-
H. Sprong			HS2	Veis	-	Holland	-	-
H. Sprong			HS3	Veis	-	Rumeenia	-	-
H. Sprong	ROM1	-	HS4	Veis	-	Rumeenia	-	G1
H. Sprong	NET1	-	HS5	Horse	-	Holland	G4	G4
H. Sprong			HS6	Inimene	-	Holland	G1	-
H. Sprong			HS7	Inimene	-	Türgi	G1	-
H. Sprong			HS8	Inimene	-	Maroko	G1	-
A. Varcasia			V1	Hobune	-	Itaalia, Sardiinia	G4	-
A. Varcasia			V2	Hobune	-	Itaalia, Sardiinia	G4	-

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
A. Varcasia			V3	Hobune	-	Itaalia, Tuscany	G4	-
A. Varcasia			V4	Lammas	-	Itaalia, Sardiinia	G1	-
A. Varcasia			V5	Lammas	-	Itaalia, Sardiinia	G1	-
A. Varcasia			V6	Lammas	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	-
A. Varcasia	ITA6	-	V7	Lammas	-	Itaalia, Sitsiilia	G1	G3
A. Varcasia	GRE1	-	V8	Lammas	-	Kreeka	G1	G1
A. Varcasia	GRE2	-	V9	Kits	-	Kreeka	G7	G7
A. Varcasia	ITA7	IT3	V10	Siga	-	Itaalia, Sardiinia	G7	G7
A. Varcasia	ITA8	IT3	V11	Siga	-	Itaalia, Sardiinia	G7	G7
A. Varcasia	ITA9	-	V13	Lammas	-	Itaalia, Emilia Romagna	G3	G3
A. Varcasia			V14	Siga	-	Itaalia, Sardiinia	G7	-
A. Varcasia			V15	Lammas	-	Itaalia, Emilia Romagna	G3	-
A. Varcasia			V16	Lammas	-	Itaalia, Emilia Romagna	G3	-
A. Varcasia			V17	Lammas	-	Kreeka	G3	-
A. Varcasia			V18	Lammas	-	Kreeka	G3	-
	EST1	-	Eg 9	Hunt	Peensool	Eesti, Järvamaa	G10	
	EST2	-	Eg 11	Põder	Kops	Eesti, Lahemaa	G8	
			Eg 12	Põder	Kops	Eesti, Harjumaa, Nissi	G8	-
	EST3	-	Eg 13	Põder	Kops	Eesti, Harjumaa, Aegviidu	G10	
	EST4	-	Eg 14	Põder	Maks	Eesti, Raplamaa, Vahastu	G8	
			Eg 15	Põder	Kops	Eesti, Harjumaa, Padise	G8	-
	EST5	ES1	Eg 16	Põder	Kops	Eesti, Raplamaa, Kaiu	G8	
			Eg 17	Põder	Kops	Eesti, Harjumaa, Kuusalu		-
			Eg 18	Põder	Kops	Eesti, Raplamaa, Vahastu	G8	-

Koostööpartner	Analüüsikood	Haplotüübi nimi	Laborikood	Peremees	Organ	Asukoht	Genotüüp (saadetud info)	Meie määratud genotüüp
			Eg 19	Põder	Kops	Eesti, Läänemaa, Hanila	G10	-
	EST6	ES1	Eg 20	Põder	Kops	Eesti, Raplamaa, Juuru	G8	
			Eg 21	Põder	Kops	Eesti, Raplamaa, Märjamaa	G8	-
			Eg 22	Põder	Maks	Eesti, Läänemaa, Hanila	G10	-
			Eg 23	Põder	Maks	Eesti, Harjumaa, Aegviidu	G8	-
			Eg 23a	Põder	Maks	Eesti, Harjumaa, Aegviidu	G8	-
			Eg 24	Põder	Maks	Eesti, Harjumaa, Aegviidu	G10	-
			Eg 25	Põder	Kops	Eesti, Pärnumaa, Tõstamaa	G8	-
			Eg 26a	Põder	Kops	Eesti, Raplamaa, Vardi		-
			Eg 27	Põder	Kops	-	G8	-
	EST7	ES1	Eg28a	Põder	Kops	-		
			Eg29	Põder	Kops	-		-
	EST8	ES1	Eg30	Metskits	Kops	Eesti, Soomaa, Tipu		
			Eg31	Põder	-	Eesti, Läänemaa		-
			Eg32	Põder	Emakas	Eesti, Konguta, Mäetsa		-

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liina Kinkar,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Põistang-paelussi (*Echinococcus granulosus*) genotüüpide eristamine ning fülogeograafia,

mille juhendaja on Urmas Saarma,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartu, **26.05.2014**